

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**

**Egidijus Kazlauskas**

**Aril-dihidroksifenil-tiadiazolų jungimosi su  
rekombinantiniu žmogaus Hsp90 baltymu termodinamika**

Daktaro disertacijos santrauka  
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

**Vilnius, 2016**

Disertacija rengta 2007-2016 m. Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute.  
Disertacija ginama eksternu.

**Mokslinis konsultantas** – prof. dr. **Daumantas Matulis** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

**Disertacija ginama Vilniaus universiteto Biochemijos mokslo krypties taryboje:**

**Pirmininkas** – prof. dr. **Virginijus Šikšnys** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

**Nariai :**

Prof. dr. **Saulius Šatkauskas** (Vytauto Didžiojo universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Prof. dr. **Ričardas Rotomskis** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, fizika - 02 P)

Prof. dr. **Franz-Josef Meyer-Almes** (Darmštado taikomųjų mokslų universitetas, Vokietija, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Dr. **Saulius Serva** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Disertacija bus ginama viešame Biochemijos mokslo krypties posėdyje 2016 m. birželio 14 d. 10 val. Vilniaus universiteto Junginio gyvybės mokslų centro R401 salėje.

Adresas: Saulėtekio 7, LT-10222, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiųsta 2016 gegužės 13 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: [www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)

**VILNIUS UNIVERSITY**

**Egidijus Kazlauskas**

**Thermodynamics of Aryl-dihydroxyphenyl-thiadiazole  
binding to recombinant human Hsp90**

Summary of doctoral dissertation  
Physical science, biochemistry (04 P)

**Vilnius, 2016**

The work presented in this doctoral dissertation has been carried out at the Institute of Biotechnology, Vilnius University during 2007-2016.

**Supervisor** - Prof. Dr. **Daumantas Matulis** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

#### **Evaluation board of dissertation of Biochemistry trend**

**Chairman** – Prof. Dr. **Virginijus Šikšnys** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

#### **Members:**

Prof. Dr. **Saulius Šatkauskas** (Vytautas Magnus University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

Prof. Dr. **Ričardas Rotomskis** (Vilnius university, physical sciences, physics - 02 P)

Prof. Dr. **Franz-Josef Meyer-Almes** (Darmstadt University of Applied Sciences, Germany, physical sciences, biochemistry - 04 P)

Dr. **Saulius Serva** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

The thesis defence will take place at the Joint Life Science Center, R401, Vilnius University (Saulėtekio 7, LT-10222, Vilnius, Lithuania) on 14<sup>th</sup> of June, 2016, at 10 a.m.

The summary of doctoral dissertation was sent on 13<sup>th</sup> of May, 2016.

The thesis is available at the Library of Vilnius University, and at the VU internet link: [www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)

# TURINYS

ĮVADAS.....	7
TYRIMŲ METODIKA.....	9
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	12
1. ICPD junginiai.....	12
2. ICPD jungimosi su Hsp90 tyrimas izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu .....	12
3. ICPD jungimosi įvertinimas pagal baltymo išsivyniojimo profilį .....	14
4. Su jungimusi susijusių protonizacijos reiškinų analizė.....	16
4.1. ICPD jungimasis su Hsp90N yra lydimas vieno protono pernašos.....	16
4.2. Jungimosi konstantos priklausomybė nuo pH .....	18
4.3. Su jungimusi susijusio protonizacijos reiškinio modelis.....	18
5. ICPD jungimosi su Hsp90 tikrieji parametrai .....	19
6. ICPD junginių struktūros ir giminingumo sąryšis .....	21
7. ICPD junginiai kaip Hsp90 slopikliai .....	24
7.1. ICPD junginių įtaka vėžinėms ląstelėms .....	24
7.2. Perspektyvos .....	25
IŠVADOS.....	27
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS .....	28
CURRICULUM VITAE .....	30
PADĖKA.....	31
SUMMARY .....	32
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	34

## SANTRUMPŲ IR SUTARTINIŲ ŽYMĖJIMŲ SARAŠAS

17-AAG	17-N-alilamino-17-demetoksigeldanamicinas
17-DMAG	17-dimetilaminoetilamino-17-demetoksigeldanamicinas
ANS	1-anilinonaftaleno-8-sulfoninė rūgštis
ATP	adenozino trifosfatas
DMSO	dimetil sulfoksidą
DSC	diferencinio skenavimo kalorimetrija
EC <sub>50</sub>	koncentracija, sukianti pusę maksimalaus matuojamo efekto
FTSA	fluorescencinio terminio poslinkio analizė (angl. <i>fluorescence thermal shift assay</i> )
GA	geldanamicinas
GI <sub>50</sub>	dozė, kuria yra pasiekama pusė maksimalaus augimo slopinimo
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinoetanosulfoninė rūgštis
HSP	karščio šoko baltymas (angl. <i>heat shock protein</i> )
Hsp90N	Hsp90 N-galinis domeną (atitinkamai Hsp90 $\alpha$ N, Hsp90 $\beta$ N)
IC <sub>50</sub>	pusė maksimalios slopinančios koncentracijos
intr	tikrasis (angl. <i>intrinsic</i> )
IR	infraraudonieji spinduliai
ITC	izoterminio titravimo kalorimetrija (angl. <i>isothermal titration calorimetry</i> )
MS	masių spektrometrija
n.d.	nėra duomenų
obs	stebimas/stebėtas (angl. <i>observed</i> )
RD	radisikolis
Tris	tris(hidroksimetil)aminometanas

## ĮVADAS

Nepaisant šiuolaikinės medicinos pažangos, sunkios, nepagydomos ligos išlieka aktuali problema. Pavyzdžiui, remiantis statistika, kas antras žmogus per savo gyvenimą susirgs bent viena vėžine liga [1]. Tradicinis vaistų kūrimo būdas, kuomet yra sukuriamas slopiklis vieną specifinį procesą vykdančiam baltymui, vėžio atveju nėra efektyvus, nes vėžinės ląstelės netrunka adaptuotis įvykstant slopinimą kompensuojančioms genomo mutacijoms. Todėl neretai yra bandomi įvairūs vaistų, kurių taikiniai būtų skirtingi, deriniai.

Hsp90 yra šaperonas, turintis palyginti siaurą klientų ratą, tačiau per juos įtakojantis didelę dalį žmogaus baltymų. Dauguma Hsp90 klientų yra svarbūs įvairiuose signaliniuose ląstelės keliuose (transkripcijos veiksniai, kinazės, kt.) [2]. Visuose pagrindiniuose vėžėjimo molekulinuose procesuose dalyvauja Hsp90 klientai [3]. Be to, vėžinėms ląstelėms reikia kur kas didesnio šaperonų kiekio nei įprastoms ląstelėms – stabilizuoti mutavusius baltymus ir išlaikyti proteostazę itin nepalankiomis sąlygomis. Todėl Hsp90 slopinimas visų pirma paveiktų vėžines ląsteles ir galėtų stabdyti visus vėžėjimo procesus vienu metu. Dabartiniais duomenimis, Hsp90 slopikliai galėtų būti naudojami ne tik kaip priešvėžiniai vaistai, bet ir įvairių kitų ligų, pavyzdžiui, neurodegeneratyvinių ar pirmuonių sukeltamų, atvejais.

Nors yra sukurtas ne vienas sintetinis Hsp90 slopiklis, o su keliais iš jų yra atliekami ir klinikiniai tyrimai, šiuo metu dar nei vieno Hsp90 slopiklio nėra naudojama klinikoje. Dauguma tirtų Hsp90 slopiklių pasižymi įvairiais skirtingais pašaliniais poveikiais. Todėl yra didelis naujų, efektyvių Hsp90 slopiklių poreikis.

Vilniaus universitete buvo susintetinta nauja potencialių Hsp90 slopiklių grupė, aril-dihidroksifenil-tiadiazolai (toliau vadinami ICPD). Vystydami šiuos junginius kaip naują potencialų priešvėžinį vaistą, tuo pačiu galime pagilinti termodinaminio vaistų kūrimo metodiką. Ilgą laiką vaistų kūrimas buvo paremtas sąveikos kontaktų optimizavimu atlikus struktūrinę analizę, tačiau tokie metodai neleidžia suprasti susidarančių molekulinų sąveikų varomųjų jėgų [4]. Tuo tarpu termodinaminė analizė leidžia kur kas geriau suprasti baltymo—ligando jungimosi procesą.

Termodinaminiai tyrimai leidžia ne tik įvertinti sąveikos stiprumą, bet taip pat ir išskirti entalpinį ir entropinį jungimosi reakcijos dėmenis, iš ko galima spręsti apie sąveikos prigimtį. Paprastai yra kur kas sunkiau padidinti entalpinį indėlį į jungimosi Gibso energiją nei entropinį, nes teisingai sumodeliuoti nekovalentes polines sąveikas yra žymiai sudėtingiau nei įvesti papildomas hidrofobines grupes [5; 6].

Vienas didžiausių molekulinės biofizikos iššūkių yra suprasti koreliaciją tarp termodinaminių ir struktūrinių duomenų [7]. Yra pastebėta, kad eksperimentų metu stebimi termodinaminiai parametrai ne visada gerai koreliuoja su struktūriniais duomenimis. Todėl yra svarbu nustatyti tikruosius termodinaminius parametrus, kurie pasitarnauja kaip koncepcinis įrankis jungimosi energijoms analizuoti struktūriniame ir cheminiame kontekstuose [8]. Tikruosius parametrus galima apskaičiuoti iš stebimųjų verčių atimant įvairių su jungimosi susijusių reiškinų termodinaminius parametrus. Deja, atliekant tokio pobūdžio tyrimus, iki šiol tenka kiekvieną atvejį nagrinėti atskirai, taip pamažu renkant duomenis apie tai, kaip nedideli cheminės struktūros pokyčiai įtakoja tikrąsias jungimosi energijas.

**Darbo tikslas:**

Ištirti ICPD junginių jungimosi su Hsp90 struktūros-termodinamikos sąryšį.

**Darbo uždaviniai:**

1. Įvertinti ICPD junginių giminingumą rekombinantiniam žmogaus Hsp90 baltymui.
2. Ištirti galimus molekulinis įvykius, susijusius su ICPD jungimusi su Hsp90.
3. Ištirti ICPD jungimosi su rekombinantiniu žmogaus Hsp90 termodinaminį mechanizmą, nustatant tikruosius termodinaminius parametrus.
4. Nustatyti sąryšį tarp kiekvieno ICPD junginio struktūros ir jo jungimosi su Hsp90 termodinaminių parametrų.

**Mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė**

Šiame darbe mes pristatome naujų Hsp90 slopiklių grupę, vadinamą ICPD, kurios pagrindu galėtų būti sukurti vaistai nuo kai kurių vėžio formų (ką liudija ląstelių augimo slopinimo tyrimai), taip pat tam tikrų kitų ligų. Šių junginių struktūros pagrindą sudaro unikalus tiadiazolo žiedas ir natūraliam Hsp90 slopikliui radisikoliui būdinga resorcinolio grupė. Darbe pateikiame ICPD slopiklių jungimosi su rekombinantiniu žmogaus Hsp90 baltymu detalų termodinaminį apibūdinimą. Siekdami išsiaiškinti baltymo—ligando jungimosi termodinaminį mechanizmą, mes apjungėme izoterminę titravimo kalorimetriją ir baltymų išsivyniojimo profilių analizę. Mes parodėme pirmą kartą, kad resorcinolio grupę turinčių Hsp90 slopiklių jungimuisi prie taikinio būtina šių junginių hidroksi grupės protonizacija. Kadangi trijų mūsų junginių jungimasis su Hsp90 yra varomas daugiausiai entalpijos, jie yra puikūs kandidatai tolesniam optimizavimui. Remiantis mūsų tyrimais, šie junginiai buvo patentuoti Europoje ir JAV.



# TYRIMŲ METODIKA

## Reagentai

Darbui naudotos aukščiausio grynumo laipsnio cheminės medžiagos: ANS (amonio 1-anilinonaftaleno-8-sulfonato hidratas,  $\geq 97$  %) ir  $H_3PO_4$  (85 % tirpalas) buvo įsigyti iš „Sigma Aldrich“;  $CH_3COONa$  ( $\geq 99$  %) ir  $Na_2HPO_4$  ( $\geq 99$  %) – iš „Fluka Chemie“; DMSO ( $\geq 99,5$  %), HEPES ( $\geq 99,5$  %),  $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$  ( $\geq 98$  %), NaCl ( $\geq 99,5$  %) – iš „Roth“; HCl (36,5–38 % tirpalas) ir NaOH ( $\geq 98$  %) – iš „Alfa Aesar“,  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$  ( $\geq 99,5$  %) – iš „Spectrum Chemical MFG corp.“;  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  (99,4 %) – iš „Fisher Scientific“; Tris ( $\geq 99,9$  %) ir Tris-HCl ( $\geq 99$  %) – iš „Sigma“.

## Baltymai

Rekombinantiniai žmogaus Hsp90 $\alpha$ , Hsp90 $\beta$  ir jų N-domenai buvo pagaminti *Eschericia coli* ląstelėse. Juos išgrynino V. Michailovienė VU Biotechnologijos instituto Biotermodynamikos ir vaistų tyrimų skyriuje.

## Ligandai

5-Aril-4-(5-pakeistus-2,4-dihidroksifenil)-1,2,3-tiadiazolus (ICPD; 80-97 % grynumo) susintetino prof. dr. I. Čikotienė VU Biotechnologijos instituto Biotermodynamikos ir vaistų tyrimų skyriuje, bendradarbiaujant su VU Chemijos fakultetu. 17-AAG buvo įsigytas iš Selleckchem (99,88 %).

## Buferiniai tirpalai

Fosfatinis buferis: 50 mM fosfato, 100 mM NaCl. Reikiamas pH buvo pasiektas sumaišant  $H_3PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $NaH_2PO_4$  ir  $Na_3PO_4$  tirpalus reikiamu santykiu.

Tris buferis: 50 mM Tris, 100 mM NaCl. Reikiamas pH buvo pasiektas sumaišant Tris ir Tris-HCl tirpalus reikiamu santykiu.

HEPES buferis: 50 mM HEPES, 100 mM NaCl. Reikiamas pH buvo pasiektas įpilant reikiamą kiekį NaOH tirpalo ir praskiedžiant vandeniu iki galutinio tūrio.

Universalus buferis: 50 mM fosfato, 50 mM  $CH_3COOH$ , 25 mM  $Na_2B_4O_7$ , 100 mM NaCl. Reikiamas pH buvo pasiektas sumaišant  $H_3PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $NaH_2PO_4$  ir  $Na_3PO_4$  tirpalus reikiamu santykiu.

## Izoterminio titravimo kalorimetrija

Izoterminio titravimo kalorimetrijos (ITC) eksperimentus atlikome VP-ITC kalorimetru („MicroCal, Inc.“). Baltymo ir ligando tirpalus paruošdavome vienodame buferyje. DMSO koncentracija neviršijo 2 %. Kiuvetę (aktyvus tūris – 1,4315 mL) užpildydavome baltymo tirpalu (2–6  $\mu M$ ), o titravimo švirkštą (300  $\mu L$ ) – ligando tirpalu (20–60  $\mu M$ ). Baltymo tirpalą titruodavome 25-30 10  $\mu L$  ligando tirpalo injekcijomis kas 3-4 minutes, maišant 260 aps./min greičiu. Eksperimento metu temperatūra (7-43  $^{\circ}C$ ) buvo palaikoma pastovi.

Gautus eksperimentinius duomenis analizavome „MicroCal Origin 5.0“ programinės įrangos ITC moduliui, išskaičiuojančiu stebimąją jungimosi konstantą ( $K_{b\_obs}$ ), stebimąją jungimosi entalpiją ( $\Delta_b H_{obs}$ ) ir koncentracijos korekcijos faktorių  $n$ .  $K_{b\_obs}$  ir  $\Delta_b H_{obs}$  nustatymo paklaida  $\sim 10$  %, o  $n$  – 5 % [9].

ITC didžiausio patikimumo intervalui apibrėžti naudojamas Wiseman faktorius  $c$ :

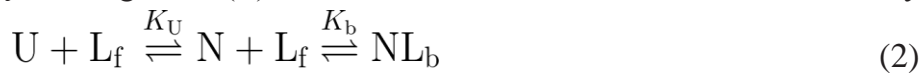
$$c = nK_b P_t \quad (1)$$

Šioje formulėje  $n$  yra ligando prisijungimo prie baltymo vietų skaičius, o  $P_t$  – baltymo koncentracija. Pageidautina, kad  $c$  vertė būtų 5-500 intervale [10; 11].

### Fluorescencinio terminio poslinkio tyrimai

Fluorescencinio terminio poslinkio tyrimus (FTSA) atlikome Corbett Rotor-Gene 6000 („Qiagen Rotor-Gene Q“) spektrofluorimetru. Paruošdavome 5 arba 10  $\mu\text{M}$  baltymo ir nuo 0 iki 200  $\mu\text{M}$  ligando tirpalus Fosfatiniame arba Universaliame buferyje. Bendras reakcijos tirpalo tūris būdavo 10 arba 20  $\mu\text{L}$ , iš kurių 2 % sudarė DMSO.

Eksperimentų metu palaipsniui (1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) kėlėme mėginio temperatūrą nuo 25 iki 95  $^{\circ}\text{C}$  ir stebėjome solvatochrominio dažo 1-anilinonaftaleno-8-sulfoninės rūgšties (ANS; 50  $\mu\text{M}$ ) fluorescencijos pokyčius, sužadindami ANS  $365 \pm 20$  nm šviesa ir registruodami  $460 \pm 15$  nm bangos ilgio šviesos emisiją. Šie fluorescencijos pokyčiai atspindi temperatūros sukeltą baltymo virsmą iš natyvaus (N) į išsivyniojusį (U). Šį virsmą gali įtakoti ligandas (L), stabilizuodamas arba destabilizuodamas baltymą:



Procesą aprašo dvi pusiausvyros konstantos –  $K_b$  ir baltymo išsivyniojimo konstanta  $K_U$ :

$$K_U = \frac{[U]}{[N]} = e^{-\Delta_U G/RT} \quad , \quad K_b = \frac{[NL_b]}{[N][L_f]} = e^{-\Delta_b G/RT} \quad , \quad (3)$$

kur  $L_f$  – laisvas ligandas;  $L_b$  – su baltymu susirišęs ligandas;  $\Delta_U G$  ir  $\Delta_b G$  yra atitinkamai išsivyniojimo ir jungimosi Gibso energijos;  $R$  – universalioji dujų konstanta;  $T$  – absoliuti temperatūra (K).

Išsivyniojant Hsp90N baltymams, stebėjome vieną fluorescencijos sužadavimo piką, būdingą homogeniniams vieno domeno baltymų preparatams. Baltymo stabilumo kreivės vidurio taškas yra vadinamas lydymosi temperatūra,  $T_m$ . Šioje temperatūroje pusė baltymo molekulių yra natyvios būsenos, kita pusė – išsivyniojusi.  $T_m$  vertes nustatėme eksperimentų metu gautas baltymo lydymosi kreives modeliuodami pagal lygtį (4):

$$y(T) = y_N + \frac{y_U - y_N}{1 + e^{-\Delta_U G/RT}} = y_U + \frac{y_N - y_U}{1 + e^{-\Delta_U G/RT}} \quad , \quad (4)$$

kur  $y(T)$  yra stebimos fluorescencijos priklausomybė nuo temperatūros;  $y_N$  ir  $y_U$  – dažo, prisijungusio prie atitinkamai natyvaus arba išsivyniojusio baltymo, fluorescencija (aprašo linijines išsivyniojimo kreivės dalis).  $T_m$  nustatymo tikslumas yra  $\pm 0,5$   $^{\circ}\text{C}$ , tačiau vienu metu atliekamų eksperimentų atsikartojamumas yra  $\pm 0,02$   $^{\circ}\text{C}$ .

Siekdami nustatyti  $K_b$ , atlikome eilę eksperimentų esant skirtingoms ligandų koncentracijoms. Priklausomai nuo baltymo—ligando sąveikos stiprumo, didėjant ligando koncentracijai, didėjo  $T_m$ .  $T_m$  priklausomybė nuo ligando koncentracijos mūsų atveju gali būti aprašoma lygtimi (5):

$$L_t = (K_U - 1) \left( \frac{P_t}{2K_U} + \frac{1}{K_b} \right) \quad (5)$$

kur  $L_t$  yra viso pridėto ligando koncentracija;  $K_b$  ir  $K_U$  yra išskleidžiamos pagal (3) lygtį.  $K_b$  nustatėme derindami (4) lygties parametrus, kad modelis tinkamai aprašytų eksperimentinius duomenis.

### Diferencinio skenavimo kalorimetrija

Diferencinio skenavimo kalorimetrijos (DSC) eksperimentus atlikome MC-2 skenavimo kalorimetru („MicroCal, Inc.“). 1,1551 mL kiuvetę užpildydavome buferiniu

tirpalu su 10  $\mu\text{M}$  baltymo ir nuo 0 iki 100  $\mu\text{M}$  ligando. Palyginamąją kiuvetę užpildydavome tokiu pačiu buferiniu tirpalu, tik be baltymo ir ligando. Temperatūrą kėlėme 1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  greičiu. Gautus duomenis analizavome „MicroCal Origin 5.0“ programinės įrangos DSC moduliui.

### Su jungimusi susijusių protonizacijos reiškinų analizė

ICPD junginių  $pK_a$  vertes suskaičiavome naudodamiesi „MarvinSketch“ programine įranga [12], baltymo aminorūgščių – internetiniu įrankiu „H++“ [13].

Su jungimusi susijusi protonizacija pasireiškia kokios nors ligando arba baltymo grupės  $pK_a$  vertės pokyčiu jungimosi reakcijos metu. Kad galėtų įvykti jungimosi reakcija, ligando ir baltymo sąveikos paviršiai turi būti tam tikro protonizacijos laipsnio. Jei dėl tirpalo pH molekulės protonizacija yra kitokia nei būtina jungimosi reakcijai, protonas yra prisijungiamas iš buferinės medžiagos (arba atiduodamas buferinei medžiagai). Esant tokiam tirpalo pH, stebimoji jungimosi konstanta  $K_{b\_obs}$  bus mažesnė nei tokiam pH, kuriame protonų apykaita su buferiu nebus būtina, nes papildoma energija bus sunaudota protono atplėšimui nuo buferinės medžiagos ir prisijungimui (arba atidavimui buferinei medžiagai). Tokiu atveju  $K_{b\_obs}$  sąryšis su  $K_{b\_intr}$  gali būti aprašomas lygtimi (6) [8; 14]:

$$K_{obs} = K_{intr} \frac{1 + 10^{pH - pK_a^b}}{1 + 10^{pH - pK_a^f}}, \quad (6)$$

kur  $K_a^b$  ir  $K_a^f$  yra protonų disociacijos nuo atitinkamai surišto ir laisvo ligando (arba baltymo) konstantos. Suminis jungimosi reakcijos metu ligando (ar baltymo) prisijungtų protonų skaičius  $n$  yra skirtumas tarp protonų įsisotinimo dalies laisvame ir susijungusiame būviuose:

$$n = f_p^b - f_p^f = \frac{10^{pK_a^b - pH}}{1 + 10^{pK_a^b - pH}} - \frac{10^{pK_a^f - pH}}{1 + 10^{pK_a^f - pH}} \quad (7)$$

ITC metodu galima nustatyti  $n$  vertę, kadangi ji įtakoja stebimąją jungimosi entalpiją:

$$\Delta_b H_{obs} = \Delta_b H_{debuff} + n \Delta_b H_{buferis}, \quad (8)$$

kur  $\Delta_b H_{debuff}$  yra teorinė entalpija, kurią stebėtume buferyje, kurio jonizacijos entalpija ( $\Delta_b H_{buferis}$ ) būtų lygi nuliui. Tuo atveju, kai protonizacija yra vienintelis su jungimusi susijęs reiškinys, tikroji entalpija ( $\Delta_b H_{intr}$ ) gali būti apskaičiuojama pagal lygtį (9):

$$\Delta_b H_{intr} = \Delta_b H_{obs} - n \Delta_b H_{buferis} - n \Delta_b H_{kompleksas} \quad (9)$$

### Kristalinių struktūrų analizė

Hsp90 ir ICPD junginių kristalines struktūras (PDB kodai 2YI0, 2YI5, 2YI6, 2YI7) nustatė dr. S. M. Roe ir dr. C. Prodromou Susekso universitete, Didžiojoje Britanijoje. Struktūrų vizualizacijai naudojome „Discovery Studio Visualizer 4.5“ [15] ir „PyMol“ [16] programinę įrangą. Struktūrų palyginiai atlikti „PyMol“.

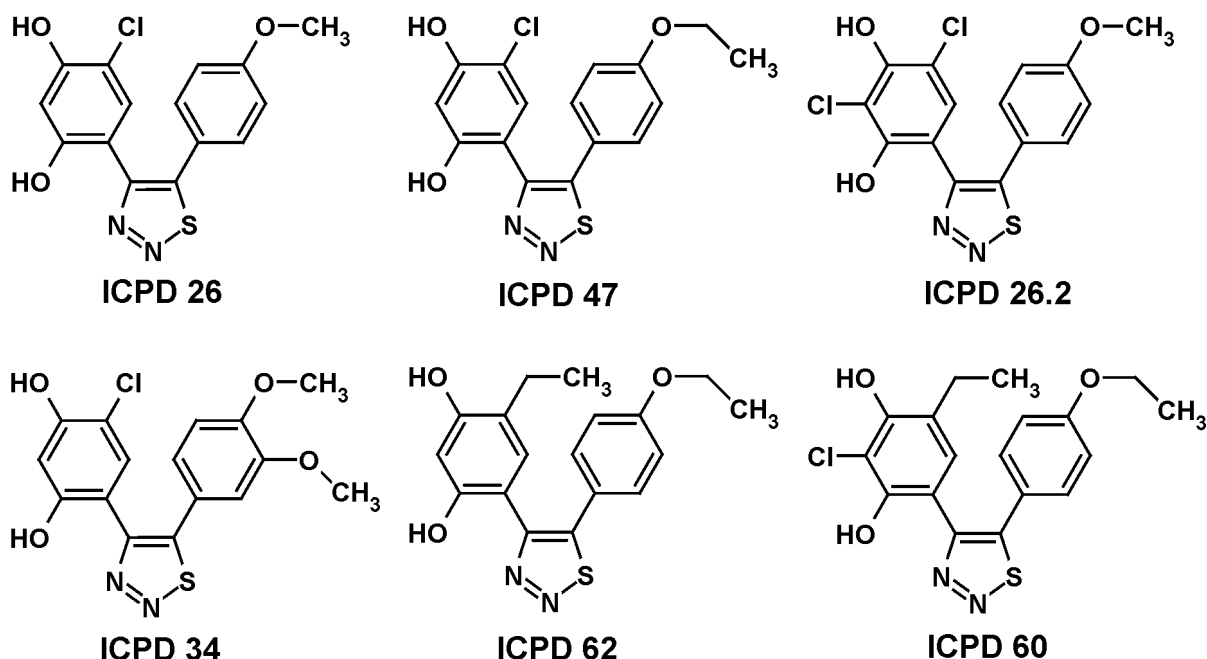
### Ląstelių tyrimai

ICPD junginių įtaką U2OS ir HeLa ląstelių vėžinių ląstelių gyvybingumui tetrazolio/formazano tyrimu [17] įvertino dr. J. Matulienė ir dr. V. Petrikaitė VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje. Dr. S. Y. Sharp Vėžio tyrimų institute, Didžiojoje Britanijoje, nustatė šių junginių įtaką HCT116 ląstelių vėžinėms ląstelėms sulforhodamino B tyrimais [18] ir baltymų „Western blot“ analize.

# REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

## 1. ICPD junginiai

Nuo ATP priklausomos Hsp90 funkcijos (baltymų suvyniojimas ir stabilizacija) atlieka svarbų vaidmenį įvairių vėžinių ligų eigoje. Hsp90 N-domene esančioje ATP surišimo kišenėje prisijungti gali du natūralūs slopikliai: radisikolis (RD) ir geldanamycinas (GA). Abu šie junginiai turi farmakologinių savybių, dėl kurių negali būti efektyviai pritaikyti medicinoje, todėl yra aktyviai ieškoma struktūriškai panašių junginių, kurie būtų netoksiški efektyvūs Hsp90 slopikliai [19]. Yra tirti diarilpirazolų [20] ir diarilizoksazolų [21; 22] dariniai, su keliais tokiais junginiais yra atliekami klinikiniai tyrimai [23]. Nors Hsp90 yra svarbus vaistų taikinytis [24; 25], Hsp90 jungimosi su ligandais termodinamika nėra pakankamai išnagrinėta. Anksčiau mūsų skyriuje buvo sukurta eilė junginių, turinčių resorcinolio ir tiadiazolio grupes (aril-dihidroksifenil-tiadiazolai, toliau vadinami ICPD; 1 pav.). Šiame darbe mes panaudojome du nepriklausomus metodus – ITC ir terminio baltymo išsivyniojimo profilio analizę (FTSA ir DSC),– kad nustatytume ICPD jungimosi su rekombinantinių žmogaus Hsp90 $\alpha$  ir Hsp90 $\beta$  baltymų N-domenais (toliau vadinamais atitinkamai Hsp90 $\alpha$ N ir Hsp90 $\beta$ N) termodinaminius parametrus.



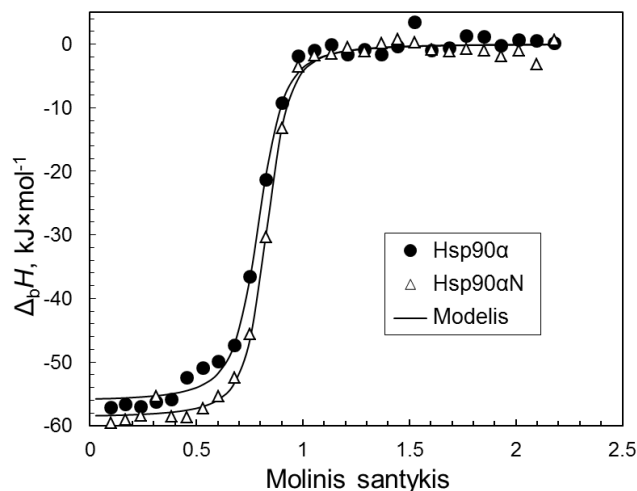
1 pav. Tirtų ICPD junginių struktūrinės formulės.

## 2. ICPD jungimosi su Hsp90 tyrimas izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu

Pagrindinis mūsų naudotas metodas ICPD jungimosi su Hsp90 energijų nustatymui buvo ITC. Šiuo metodu galima nustatyti visus svarbiausius jungimosi reakcijos

termodinaminius parametrus: jungimosi konstantą ( $K_b$ ), entalpiją ( $\Delta_b H$ ), entropiją ( $\Delta_b S$ ) ir šiluminę talpą ( $\Delta C_p$ ) [24; 26].

Mūsų duomenimis, ICPD jungimosi su Hsp90N termodinaminiai parametrai atitinka jungimosi su pilno ilgio Hsp90 duomenis, tiek  $\alpha$  (2 pav.), tiek  $\beta$  izoformų atvejais. Todėl tolesniuose tyrimuose naudojome daugiausiai Hsp90N, kuris yra kur kas tinkamesnis FTSA eksperimentams.

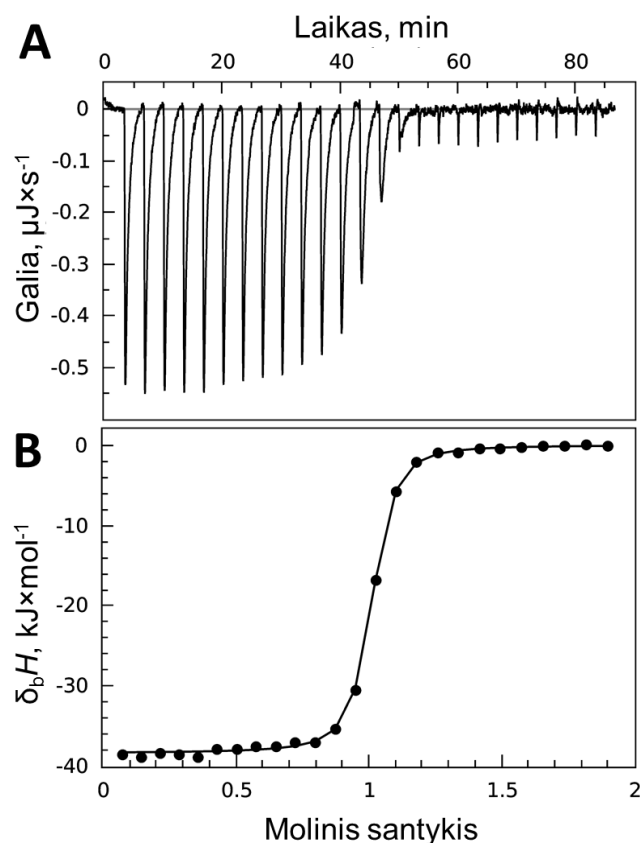


**2 pav.** ICPD47 jungimosi su 6  $\mu\text{M}$  pilno ilgio Hsp90 $\alpha$  baltymu ir su Hsp90 $\alpha\text{N}$  integruotos ITC kreivės. Kreivių skirtumai yra eksperimentinių paklaidų ribose. Matavimai atlikti Fosfatiniame buferyje, pH 7,5, 37 °C temperatūroje.

ITC metodu mes išmatavome šešių ICPD junginių (1 pav.) jungimosi su Hsp90N energijas. Dar pirminių eksperimentų metu paaiškėjo, kad du iš jų, ICPD26.2 ir ICPD60, nesijungia su Hsp90N. Tuos keturis ICPD junginius, kurie jungiasi su Hsp90N, ištyrėme detaliau.

Tipiniai neapdoroti titravimo duomenys yra pateikti 3 paveiksle. Visų ICPD jungimosi atvejais stebimosios jungimosi entalpijos pokytis ( $\Delta_b H_{\text{obs}}$ ) buvo egzoterminis. Iš integruotos ITC kreivės statumo galima spręsti, kad junginio giminingumas baltymui yra didelis. Pavyzdžiui, Fosfatiniame buferyje, pH 7,5, 37 °C temperatūroje, šių ICPD junginių  $K_{b, \text{obs}}$  vertės varijavo nuo  $1,8 \times 10^7$  iki  $1,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ . ICPD34 jungėsi akivaizdžiai silpniau nei kiti 3 ICPD junginiai. Šios vertės yra didesnės nei natūralaus Hsp90 substrato ATP ( $K_{b, \text{obs}} = 7,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ , esant 25 °C temperatūrai ir pH 7,4) [27; 28]. Šią tendenciją stebėjome ir kitomis eksperimentų sąlygomis.

ITC metodu nustatytų  $K_b$  verčių patikimumą galima įvertinti  $c$  vertės pagalba [10; 11]. Visų keturių tiriamų ICPD junginių jungimosi su tirtais Hsp90 konstruktais stochiometrija buvo 1 slopiklio molekulė : 1 baltymo ATP-surišimo kišenė. Todėl mūsų eksperimentų sąlygomis (6  $\mu\text{M}$ ) tiksliai pamatuoti galime tik iki  $8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  stebimąsias jungimosi konstantas. Stipriausiai besijungiantys ICPD junginiai, ICPD47 ir ICPD62, šias ribas pasiekia ir jau minėtomis sąlygomis. Esant žemam pH, jungimasis yra dar stipresnis, dėl ko jo stiprumo negalime patikimai nustatyti ITC metodu, todėl tam turėjome pasitelkti papildomą metodą. Tačiau ITC metodas leidžia nustatyti  $\Delta_b H_{\text{obs}}$  pakankamai tiksliai ir tuomet, kai jungimasis yra itin stiprus.



**3 pav.** Tipiniai ICPD jungimosi su Hsp90 ITC duomenys. 60  $\mu\text{M}$  ICPD47 jungimosi su 6  $\mu\text{M}$  Hsp90 $\alpha\text{N}$  HEPES buferyje, pH 7,5, 37  $^{\circ}\text{C}$  temperatūroje duomenys: titravimo (viršuje) ir integruota kreivės (apačioje).

### 3. ICPD jungimosi įvertinimas pagal baltymo išsivyniojimo profilį

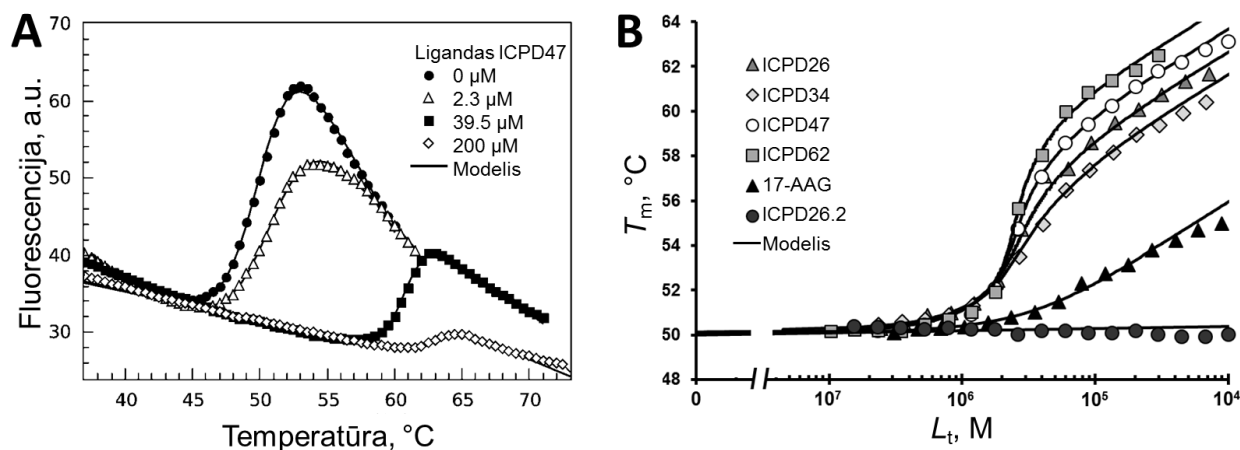
Baltymų išsivyniojimo stebėjimu pagrįsti metodai (FTSA, DSC) gali būti naudojami nustatyti bet kokioms nekovalentinio ligando jungimosi su baltymu  $K_{b\_obs}$  vertėms [29; 30], tačiau jų metu negalima nustatyti  $\Delta_b H_{obs}$ . Tokiu būdu ITC ir FTSA/DSC metodai papildoma vienas kitą [31].

Tiek FTSA, tiek DSC leidžia nustatyti  $K_b$  pagal tai, kokią įtaką ligandas turi baltymo lydymosi temperatūrai  $T_m$  [29; 31]. Išsivyniojant tirpiems vieno domeno globuliniams baltymams matyti viena tranzicija, kurią gali įtakoti prisijungę ligandai. Tačiau pilno ilgio Hsp90 yra sudarytas iš kelių domenų, todėl jo išsivyniojimo kreivė yra sudėtinga ir iš kelių smailių. Tokią kreivę interpretuoti sunku, jei iš vis įmanoma. Tuo tarpu Hsp90N išsivyniojimo kreivė turi tik vieną, aiškią smailę.

DSC yra kur kas senesnis metodas ir dėl to geriau įsitvirtinęs farmakologinėje praktikoje nei FTSA [32-34], tačiau DSC eksperimentams reikia didelių reagentų kiekių, patys eksperimentai ilgai užtrunka. Todėl mes eksperimentus atlikome kur kas didesnio našumo FTSA metodu ir kelis atvejus patikrinome DSC.

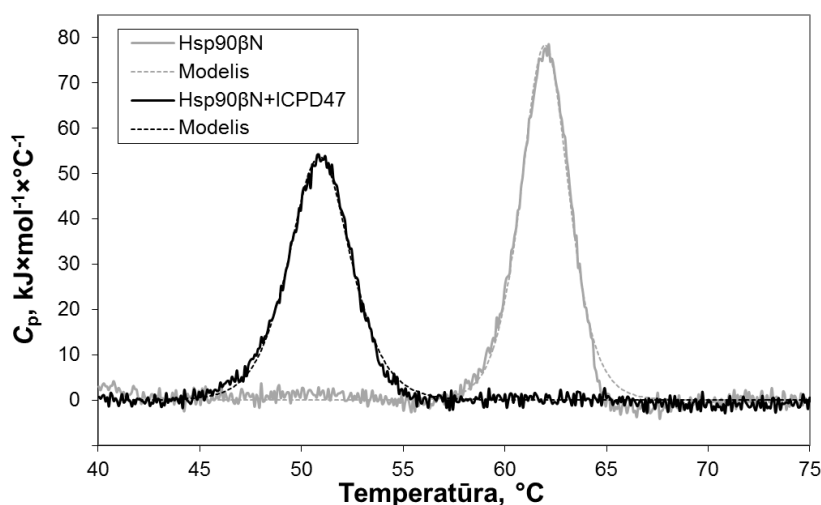
FTSA metodu mes nustatėme 4 ICPD junginių jungimosi su Hsp90N  $K_{b\_obs}$  vertes įvairiuose pH ir buferiuose tam, kad patikslintume atitinkamus ITC duomenis. Vykdydami FTSA eksperimentą su 10  $\mu\text{M}$  Hsp90N nesant ligandų, stebėdavome staigų solvatochrominio dažo ANS fluorescencijos padidėjimą tirpalui pasiekus  $\sim 50$   $^{\circ}\text{C}$  (tranzicija,  $T_m$ , stebima  $49,5 \pm 0,1$   $^{\circ}\text{C}$  Hsp90 $\alpha\text{N}$  atveju, Hsp90 $\beta\text{N}$  –  $49,1 \pm 0,2$   $^{\circ}\text{C}$ ). Ši

smailė atspindi baltymo išsivyniojimą, dėl kurio dažui tampa prieinami iki tol baltymo viduje buvę hidrofobiniai paviršiai. ICPD junginių pridėjimas (pvz., ICPD47 4A pav.) kreivių tranziciją paslinko link aukštesnių temperatūrų, nes šie junginiai susijungdami su Hsp90N jį stabilizuoja. DSC eksperimentais stebėjome tokio pačio dydžio  $T_m$  poslinkį (5 pav.).



**4 pav.** (A) Tipinių ICPD jungimosi su Hsp90N FTSA duomenų pavyzdys: neapdorotos ANS fluorescencijos kitimo kreivės palaipsniui keliant temperatūrą, ICPD47 jungiantis su 10 μM Hsp90αN, esant pH 7,5. Didinant ICPD47 koncentraciją, Hsp90αN terminės išsivyniojimo tranzicijos taškas ( $T_m$ ) slinko link aukštesnių temperatūrų. (B) 5 μM Hsp90α  $T_m$ , nustatytos FTSA metodu, priklausomybė nuo pridėtų ligandų koncentracijos ( $L_t$ ) esant pH 7,5. ICPD62 lemia didžiausią baltymo  $T_m$  poslinkį, todėl šio junginio  $K_{b\_obs}$  (bet ne  $K_{b\_intr}$ ) yra didžiausia.

Pagal (4) lygtį modeliuodami baltymo išsivyniojimo kreives, gautas FTSA eksperimentų metu, nustatėme Hsp90N lydymosi temperatūras esant įvairioms slopiklio koncentracijoms. Grafike atidėję ir pagal (5) lygtį sumodeliavę  $T_m$  priklausomybę nuo pridėto ligando koncentracijos (4B pav.), nustatėme  $K_{b\_obs}$  vertes kiekviename tirtame pH.



**5 pav.** DSC eksperimento metu vykstanti Hsp90βN baltymo terminė denatūracija, nesant ligandų (juoda linija) ir esant 100 μM ICPD47 (pilka linija).

**1 lentelė.** FTSA metodu nustatytos  $K_{b\_obs}$  vertės,  $M^{-1}$ .  $\pm$  nurodo paklaidas (kartais), apskaičiuotas iš kelių eksperimentų.

Junginys	Hsp90 $\alpha$ N	Hsp90 $\beta$ N
ICPD26	$7,6 \times 10^7 \pm 0,03 \times$	$1,0 \times 10^7 \pm 0,17 \times$
ICPD34	$2,5 \times 10^7 \pm 0,19 \times$	$4,8 \times 10^6 \pm 0,25 \times$
ICPD47	$8,8 \times 10^7 \pm 0,17 \times$	$2,3 \times 10^7 \pm 0,28 \times$
ICPD62	$1,7 \times 10^8 \pm 0,16 \times$	$4,7 \times 10^7 \pm 0,10 \times$
17-AAG	$5,8 \times 10^5 \pm 0,17 \times$	n.d.

Kaip matyti iš 4B pav. ir 1 lentelės, esant pH 7,5 (37 °C), visi 4 ICPD junginiai jungiasi su Hsp90 $\alpha$ N stipriau nei klasikinis Hsp90 slopiklis 17-AAG. ICPD26.2 (ir ICPD60) nesiriša su Hsp90N ir todėl neįtakoja šio baltymo  $T_m$ . Remiantis šiais FTSA duomenimis, ICPD junginiai gali taip būti išrikiuoti nuo stipriausio iki silpniausio slopiklio: ICPD62 > ICPD47 > ICPD26 > ICPD34. Tokia eilės tvarka būdinga ne tik pH 7,5, bet ir esant kitoms tirtoms pH vertėms. Be to, analogišką tendenciją stebėjome ir eksperimentuose su Hsp90 $\beta$ N (1 lentelė).

## 4. Su jungimusi susijusių protonizacijos reiškinų analizė

Stebimasis parametras yra tikrojo jungimosi parametro ir įvairių su jungimusi susijusių reiškinų energetinių indėlių suma. Dažniausiai stebimi su baltymo ir ligando jungimusi susiję reiškiniai yra (de)protonizacija ir konformaciniai pokyčiai [35]. Su jungimusi susijusių protonizacijos reiškinų analizę atlikome kaip aprašyta [8; 14; 36].

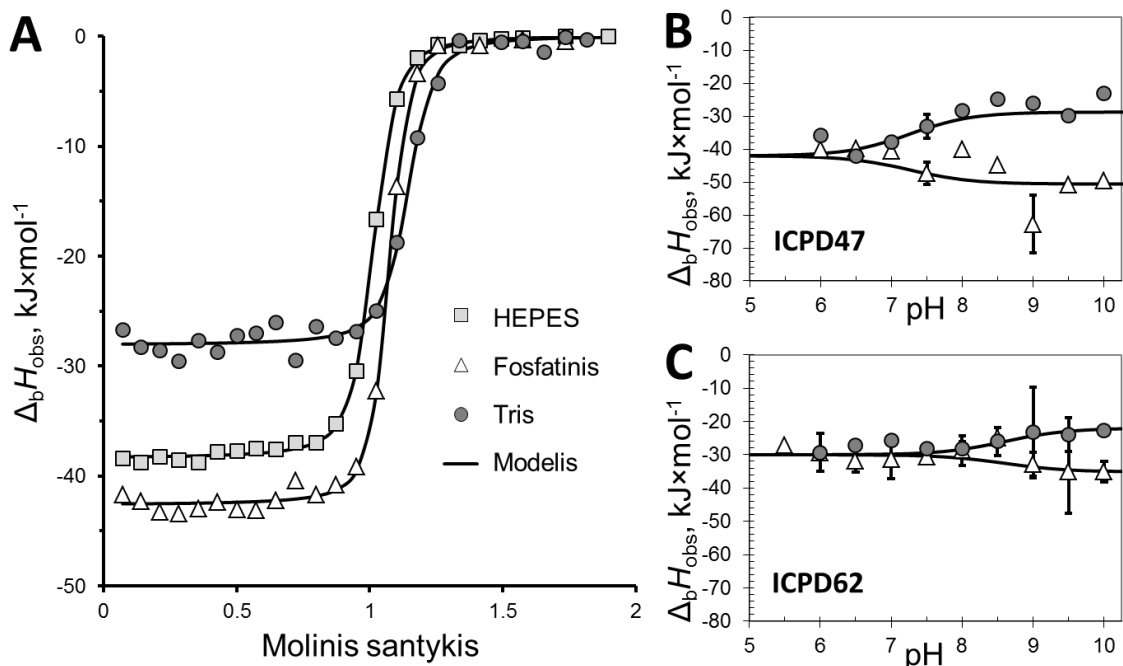
### 4.1. ICPD jungimasis su Hsp90N yra lydymas vieno protono pernašos

Dar ankstyvose tyrimų stadijose nustatėme, jog stebimosios jungimosi entalpijos stipriai priklauso nuo naudojamo buferio deprotonizacijos entalpijos (6A pav.). Susidarant baltymo—ligando kompleksui, gali pakisti labilių protonų aplinka, dėl ko labilios grupės  $pK_a$  gali skirtis nuo laisvos molekulės. Varijuodami tirpalo pH mes galime keisti nesusijusių ligando ir baltymo jonizacijos lygį. Todėl mes ištyrėme stebimosios ICPD junginių entalpijos priklausomybę nuo pH (6B pav.). Stebėjome tik vieną kreivių, apibūdinančių  $\Delta_b H_{obs}$  priklausomybes nuo pH esant skirtingoms buferinėms medžiagoms, sankirtą ( $\sim -40 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ ). Tai parodo, kad jungimosi metu yra išlaisvinamas vienas protonas. Panašūs rezultatai gauti ir su ICPD26 bei ICPD34 junginiais. Protonizacijos skirtumo tarp jungimosi prie Hsp90 $\alpha$ N ir Hsp90 $\beta$ N nebuvo.

Nors ICPD62 atveju  $\Delta_b H_{obs}$  priklausomybė nuo pH taip pat leidžia manyti vykstant tik vieno protono mainams, laisvas ICPD62 išlieka protonizuotas ir net esant pH 7,5 (6C pav.). Šis skirtumas gali būti paaiškintas ligandų struktūrų skirtumais. ICPD junginiai turi dvi hidroksilo grupes, kurios galėtų dalyvauti mūsų eksperimentuose stebimame (de)protonizacijos įvykyje. ICPD62 turi etilo grupę, esančią *orto* ir *para* padėtyse hidroksilo grupių atžvilgiu, o kiti trys ICPD junginiai toje pozicijoje turi chlorą. Skirtingas etilo ir chloro pakaitų gebėjimas nutraukti elektronus ir lemia hidroksi grupių protonizacijos skirtumus. Tai patvirtina ir „Marvin“ programine įranga [12] atlikti skaičiavimai: *para*-hidroksi grupės  $pK_a$  yra panašūs visuose ICPD junginiuose, tačiau *orto*-hidroksi pakaito  $pK_a$  yra  $\sim 9,9$  ICPD62 junginyje ir  $\sim 7,3$  kitų ICPD junginių atvejais.

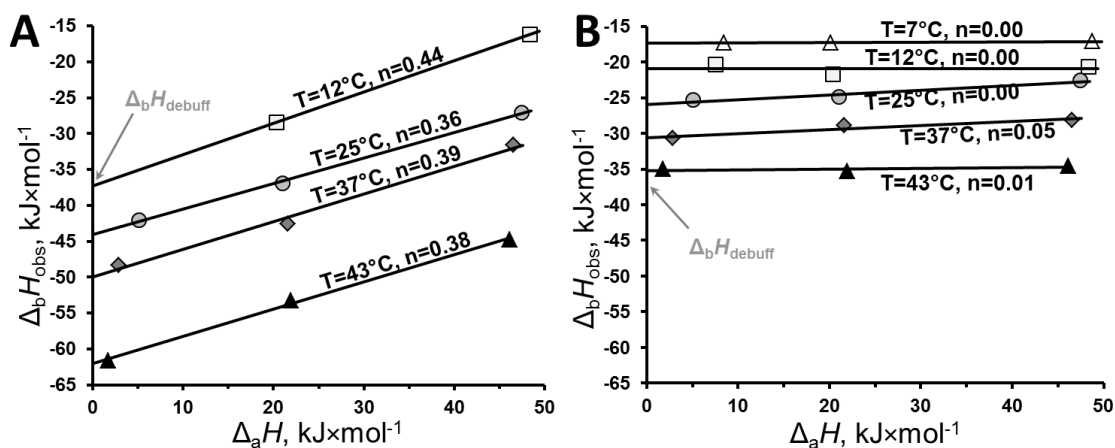


Tai parodo, jog ICPD *ortho*-hidroksi grupė turi būti protonizuota, kad įvyktų jungimasis su Hsp90.



**6 pav.** pH ir buferio įtaka ICPD jungimuisi su Hsp90N. (A) ICPD47 jungimosi su Hsp90αN integruotos ITC kreivės esant trimis skirtingoms buferinėms medžiagoms. (B) ICPD47 ir (C) ICPD62 jungimosi su Hsp90αN stebimųjų entalpijų priklausomybė nuo pH dvejuose buferiuose, ženkliai besiskiriančiais buferinės medžiagos protonizacijos entalpija (Fosfatiniam ir Tris). Paklaidos rodo keletus eksperimentų standartinį nuokrypį.

Nustatę stebimųjų jungimosi entalpijų priklausomybę nuo buferinės medžiagos deprotonizacijos entalpijos [37], įvertinome iš tirpalo paimtų protonų skaičių ligandui jungiantis su Hsp90N įvairiose temperatūrose (7 pav.). Ši priklausomybė yra tiesinė,

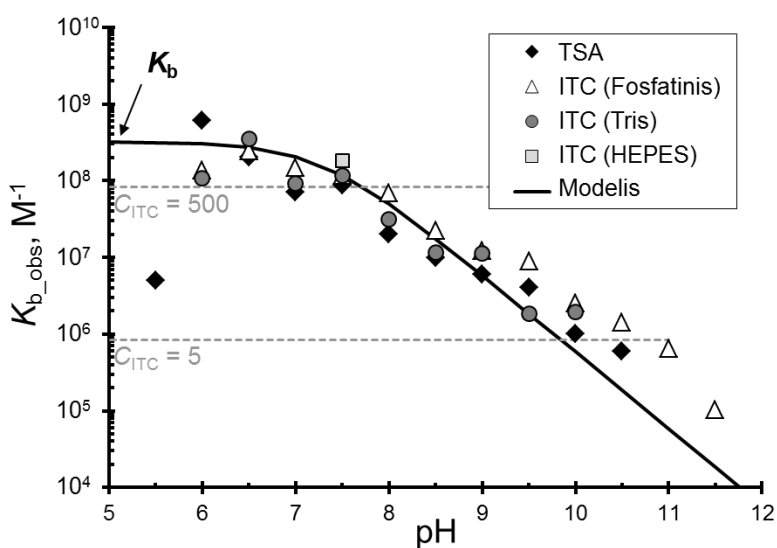


**7 pav.** (A) ICPD47 ir (B) ICPD62 jungimosi su Hsp90αN stebimųjų entalpijų priklausomybė nuo buferinės medžiagos deprotonizacijos entalpijos ( $\Delta_a H$ ) skirtingose temperatūrose, esant pH 7,5.  $\Delta_b H_{\text{debuff}}$  – entalpija, kuri būtų stebima buferyje, kurio deprotonizacijos entalpija yra nulis.

jos polinkio kampas nusako reakcijos metu buferinės medžiagos surišamų ar išskirtų protonų skaičių ( $n$ ). Dalinis skaičius ICPD junginio molekulės surištų protonų galėtų reikšti, kad tirtame pH (7,5) dalis ligando jau yra protonizuotoje formoje.

## 4.2. Jungimosi konstantos priklausomybė nuo pH

Tirpalo pH padidėjant vienu vienetu, ICPD (išskyrus ICPD62) jungimosi su Hsp90 stebijomi konstanta mažėjo apie dešimtį kartų (8 pav.). Šie rezultatai yra lengvai paaiškinami: kuo aukštesnis pH, tuo labiau dominuoja deprotonizuota ligando forma, tad daugiau protonų turi būti paiimama iš buferinės medžiagos, o šiam procesui reikia papildomos energijos. Tuo tarpu ICPD62 pradeda deprotonizuotis aukštesniame pH nei kiti junginiai, todėl ir jo  $K_{b\_obs}$  pradeda mažėti esant didesnėms pH vertėms.

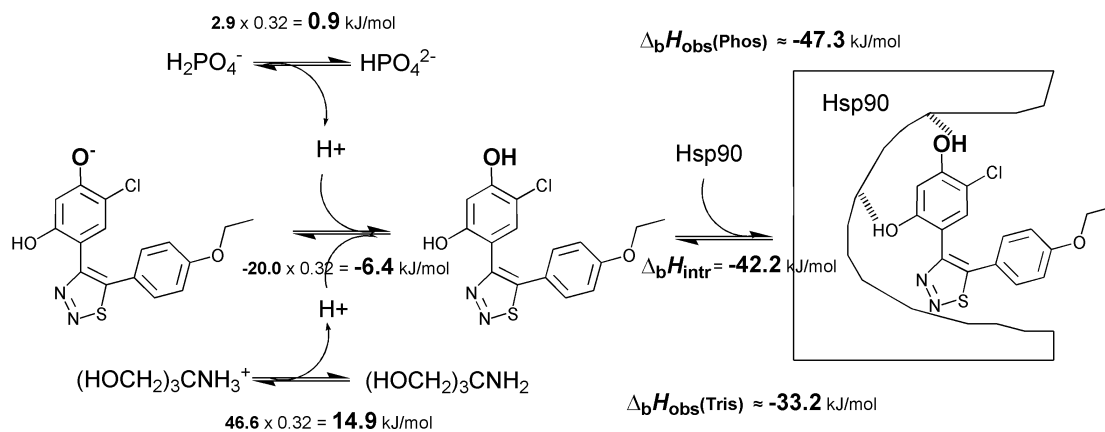


**8 pav.** Stebimosios ICPD47 jungimosi su Hsp90 $\alpha$ N konstantos priklausomybė nuo pH. Linija vaizduoja pagal (6) lygtį sumodeliuotą priklausomybę. Atkreipkite dėmesį, kad ITC duomenys mažiau patikimi, esant pH < 7,5, nes jungimasis yra per stiprus šiam metodui (ITC patikimumo intervalai yra atvaizduoti punktyrinėmis linijomis), o esant pH < 6,0 net ir FTSA duomenys yra nenaudotini, nes tokiomis sąlygomis tiriamas baltymas yra nestabilus.

## 4.3. Su jungimusi susijusio protonizacijos reiškinio modelis

9 paveikslėlis vaizduoja ICPD47 junginio hidroksi grupės protonizaciją, šiam junginiui jungiantis su Hsp90 esant aukštam pH. Su jungimusi susijusio protonizacijos reiškinio lemiami entalpiniai indėliai yra ženklūs, tad juos svarbu apskaičiuoti norint nustatyti tikruosius jungimosi parametrus. Aprašytas protonizacijos modelis tinka ir kitiems trims ICPD junginiams.

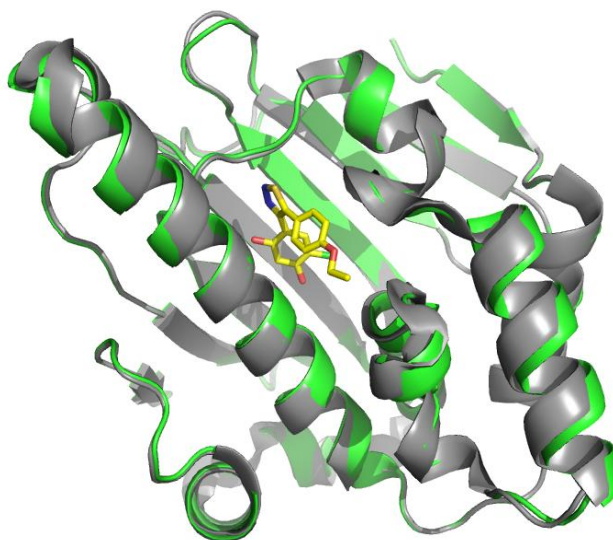
Tikroji jungimosi entalpija gali būti nustatyta iš 6B pav. pateiktų kreivių sankirtos arba, jei yra žinoma ligando protonizacijos entalpija, apskaičiuota iš  $\Delta_b H_{debuff}$  (nustatytos iš 7 pav.) pagal (9) lygtį. Ligando protonizacijos entalpiją galima nustatyti išanalizavus visus titravimo duomenis.



**9 pav.** Su jungimusi susijusių reakcijų entalpiniai indėliai: ICPD47 junginio hidroksi grupės (paryškinta) protonizacijos, buferinės medžiagos jonizacijos ir tikroji jungimosi entalpijos.

## 5. ICPD jungimosi su Hsp90 tikrieji parametrai

Eksperimentų metu gauti termodinaminiai parametrai vadinami stebimaisiais – jų vertės apima ne tik tikruosius jungimosi parametrus, bet ir įvairių su jungimusi susijusių reiškinų energijas. Nors stebimosios vertės gali būti naudojamos įvertinti sąveikos stiprumui pasirinktomis sąlygomis, tik tikrieji jungimosi parametrai gali būti koreliuojami su baltymo—ligando komplekso struktūrinėmis savybėmis [38]. Protonizacijos įtaką įvertinome 4 skyriuje, tačiau su jungimusi susijusiems konformaciniams pokyčiams įvertinti būtina struktūrinė analizė.



**10 pav.** Hsp90αN—ICPD47 komplekso (pavaizduota žaliai su geltonu ICPD47) ir nesusijungusio Hsp90αN (pilkas, PDB kodas 3T0H) struktūrų palyginimas. Hsp90αN—ICPD47 komplekso struktūros bendras vidutinis kvadratinis nuokrypis nuo laisvo Hsp90αN buvo 0,24 Å (0,23 Å ICPD24 atveju, 0,40 Å – ICPD34, 0,16 Å – ICPD62).

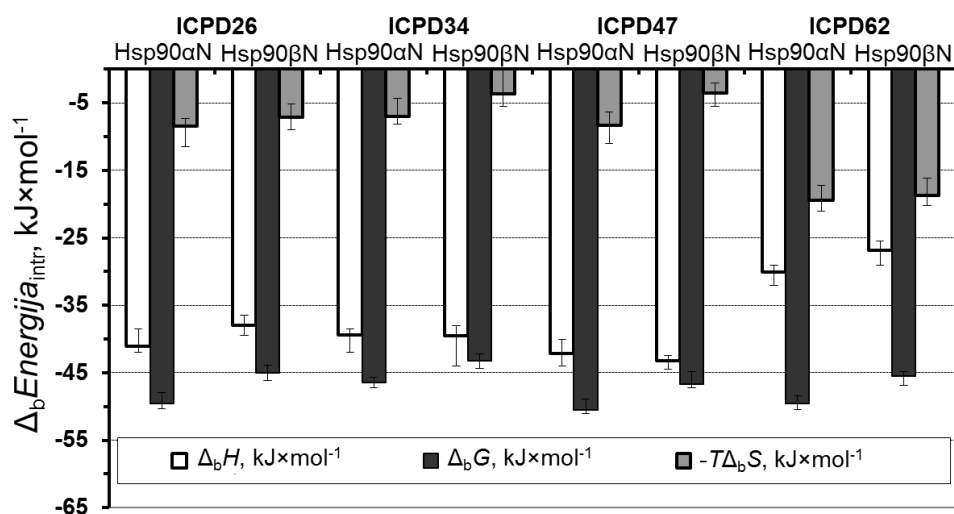
C. Prodromou su bendradarbiais Vėžio tyrimų institute (Didžioji Britanija) atlikus Hsp90 kompleksų su ICPD junginiais kristalografinę analizę, paaikškėjo, kad visi 4 ICPD junginiai jungėsi su Hsp90 panašiai, susidarant ir kitiems resorcinolio grupę turintiems ligandams būdingoms sąveikoms [39; 40]. Hsp90αN—ICPD kompleksų kristalinės

struktūros labai menkai skiriasi nuo apo Hsp90 $\alpha$ N (10 pav.). Nilapwar ir kt. nagrinėjant Hsp90 $\alpha$ N sąveiką su GA ir 17-AAG apskritiminio dichroizmo ir branduolių magnetinio rezonanso metodais, ženklių konformacinių pokyčių taip pat nebuvo pastebėta [28]. Remiantis šiais duomenimis, galimų su jungimusi susijusių Hsp90 konformacinių pokyčių įtaką jungimosi termodinaminiams parametrams galime laikyti nereikšminga.

Suskaičiavus tikruosius termodinaminius parametrus fiziologinėms sąlygoms artimoje 37 °C temperatūroje, paaiškėjo, kad visi 4 ICPD junginiai jungėsi su Hsp90 $\alpha$ N apie 4,5 karto stipriau nei su Hsp90 $\beta$ N (2 lentelė, 11 pav.). Panašūs šių dviejų žmogaus Hsp90 izoformų giminingumo skirtumai buvo pastebėti ir RD [41] bei GA [42] atvejais. Vienintelis skirtumas tarp Hsp90 $\alpha$  ir Hsp90 $\beta$  ATP surišimo kišenių yra  $\alpha$  izoformoje esantį seriną (S52)  $\beta$  izoformoje pakeitęs alaninas. Pagal giminingumą abiem Hsp90 izoformoms ICPD junginiai gali būti surikiuoti taip, nuo stipriausio iki silpniausio: ICPD47 > ICPD26 ~ ICPD62 > ICPD34.

**2 lentelė.** ICPD jungimosi su Hsp90N tikrieji termodinaminiai parametrai, esant 37 °C temperatūrai ir pH 7,5.  $\pm$  nurodo paklaidas, įvertintas sumodeliavus kelių eksperimentų duomenis.

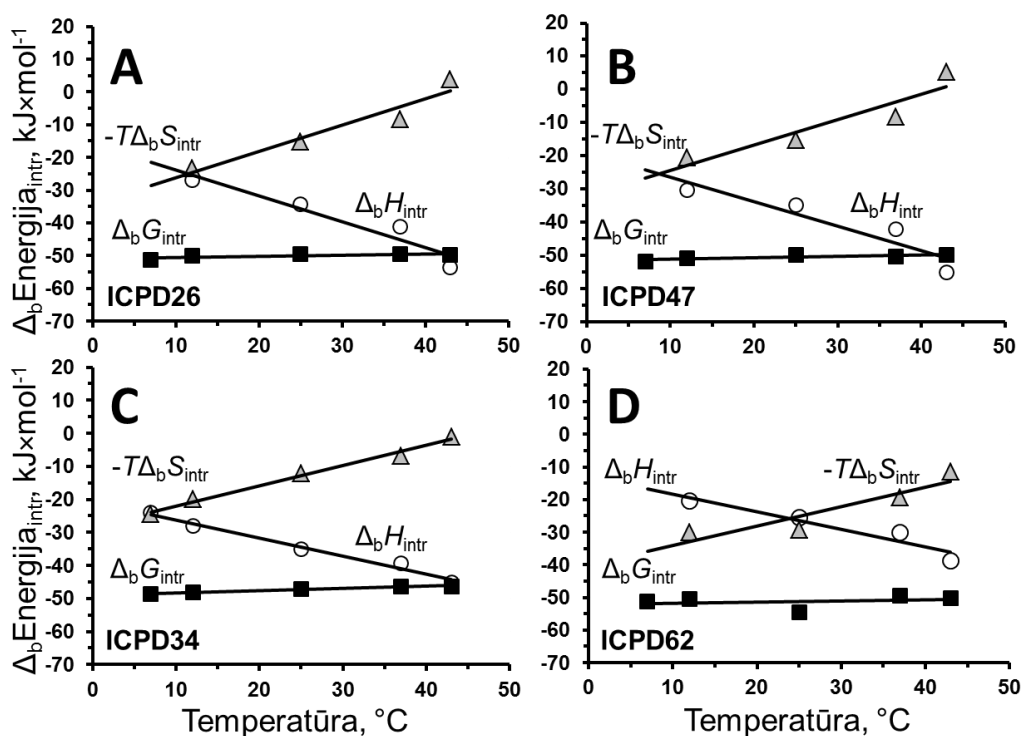
ICPD	Baltymas	$\Delta_b H_{intr}$ , kJ $\times$ mol $^{-1}$	$K_{b\_intr}$ , M $^{-1}$	$K_{d\_intr}$ , nM	$\Delta_b G_{intr}$ , kJ $\times$ mol $^{-1}$	$-T\Delta_b S_{intr}$ , kJ $\times$ mol $^{-1}$	$\Delta_b C_p$ , J $\times$ mol $^{-1}\times$ K $^{-1}$
26	Hsp90 $\alpha$ N	-41,1	$2,21\times 10^8$	4,5	-49,5	-8,4	-790
	Hsp90 $\beta$ N	-38,0	$3,9\times 10^7$	25,9	-45,1	-7,0	-650
34	Hsp90 $\alpha$ N	-39,5	$6,6\times 10^7$	15,1	-46,4	-7,0	-550
	Hsp90 $\beta$ N	-39,5	$1,9\times 10^7$	52,1	-43,3	-3,7	-640
47	Hsp90 $\alpha$ N	-42,2	$3,15\times 10^8$	3,2	-50,5	-8,3	-730
	Hsp90 $\beta$ N	-43,2	$7,3\times 10^7$	13,8	-46,7	-3,5	-700
62	Hsp90 $\alpha$ N	-30,1	$2,18\times 10^8$	4,6	-49,5	-19,4	-540
	Hsp90 $\beta$ N	-26,8	$4,7\times 10^7$	21,4	-45,5	-18,8	-340
		$\pm 1,7$	$\pm 1,5\times$	$\pm 1,5\times$	$\pm 1,1$	$\pm 2,0$	$\pm 125$



**11 pav.** Tikrųjų entalpijų ir tikrųjų entropijų indėliai į tikrąsias jungimosi Gibso energijas, ICPD jungiantis su Hsp90N 37 °C temperatūroje.

Buvo pastebėta, kad sintetinių vaistinių medžiagų jungimuisi su baltymu-taikiniu yra būdingas didesnis entropinis indėlis nei natūralių ligandų [43]. Entropijos indėlį padidinti galima „apauginant“ ligandą hidrofobiniais pakaitais, tačiau tai daryti galima tik iki tam tikros ribos, nes vaistas turi išlikti pakankamai tirpus [38]. Entalpinį indėlį didinti yra kur kas sunkiau, nes polinėms sąveikoms yra svarbesni tikslūs atstumai bei ryšių geometrija, ką yra sudėtinga teisingai prognozuoti esamais bioinformatikos įrankiais. Dėl to visų pirma turėtų būti optimizuojama entalpija, o tik vėlesnėse vaisto sukūrimo stadijose didinamas entropinis indėlis [5; 6]. ICPD26, ICPD34 ir ICPD47 atvejais, entalpija sudaro nuo 80 iki 90 % jungimosi Gibso energijos (11 pav.). Tuo tarpu ICPD62 jungimasis su Hsp90N sąlygoja entalpija ir entropija apylygėmis dalimis.

Tikrųjų jungimosi entalpijų priklausomybės nuo temperatūros (12 pav.) pokrypio kampas nusako jungimosi šiluminę talpą ( $\Delta_b C_p$ ). Visų tirtų ICPD junginių jungimosi su Hsp90 $\alpha$ N  $\Delta_b C_p$  vertės yra -540 – -660 J $\times$ mol<sup>-1</sup> $\times$ K<sup>-1</sup> intervale. Neigiamos šiluminės talpos vertės yra būdingos hidrofobinėms jungimosi reakcijoms, o šios konkrečios vertės yra panašios į GA analogų, 17-AAG ir 17-DMAG [28], bei RD [41] jungimosi su Hsp90 šiluminės talpas.



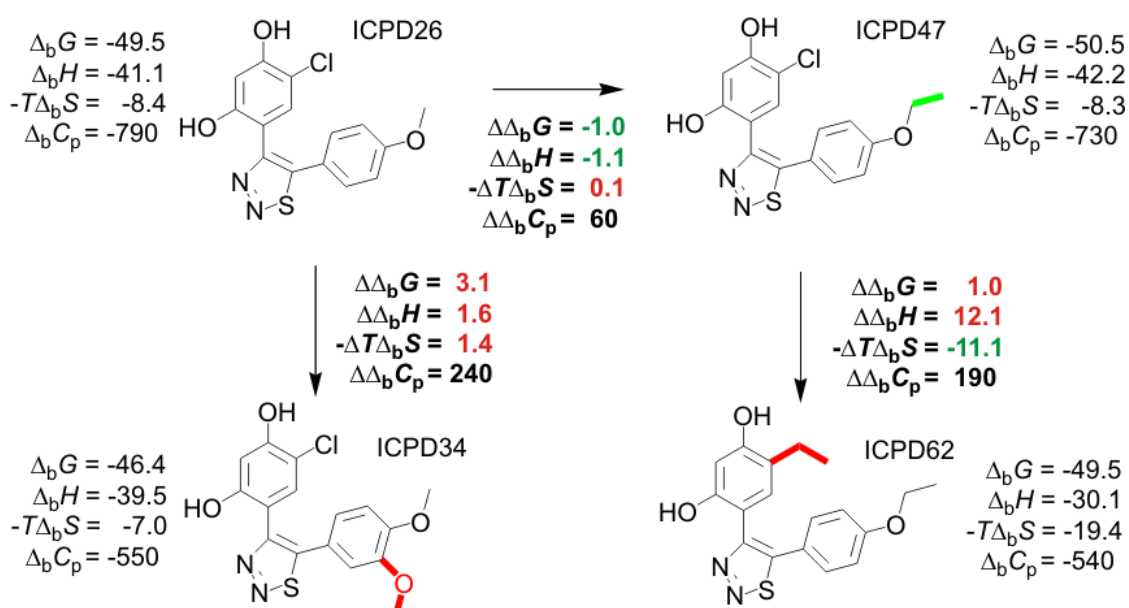
**12 pav.** (A) ICPD26, (B) ICPD47, (C) ICPD34 ir (D) ICPD62 jungimosi su Hsp90 $\alpha$ N tikrųjų termodinaminių parametų priklausomybė nuo temperatūros.  $\Delta_b G_{intr}$  vertės yra atvaizduoti juodais kvadratais,  $\Delta_b H_{intr}$  – baltais apskritimais, and  $-T\Delta_b S_{intr}$  – pilkais trikampiais.

## 6. ICPD junginių struktūros ir giminingumo sąryšis

Gebėjimas prognozuoti termodinaminius jungimosi parametrus ir giminingumą remiantis baltymo—ligando struktūra palengvintų vaistų paiešką [7]. Esami bioinformatikos įrankiai kol kas dar nesugeba patikimai atlikti tokių prognozių [6], nes esama duomenų bazė yra per maža. Todėl kompleksų molekulinė struktūra ir

termodinaminių parametų koreliacija turi būti atliekama kiekvieną atvejį detaliai išnagrinėjant individualiai.

Visų pirma mes sulyginome skirtumus tarp visų ICPD junginių jungimosi su Hsp90N tikrųjų termodinaminių parametų su ICPD junginių funkcinių grupių skirtumais (13 pav.). Antrosios metoksi grupės įvedimas, iš ICPD26 gaunant ICPD34, lemia nedidelį Gibso energijos praradimą. Papildoma metileno grupė ICPD47 junginyje, palyginus su ICPD26, mažai įtakoja termodinaminius jungimosi parametrus. Pakeičiant chloro atomą etilo grupe, iš ICPD47 gaunant ICPD62, išlošiama entropija, tačiau ją atsveria ženklus entalpijos praradimas. Verta paminėti, kad FTSA metodu nustatyta stebimoji ICPD62 jungimosi su Hsp90N konstanta buvo didesnė nei ICPD47 atveju. Tai – vienas iš pavyzdžių, kai iš stebimųjų jungimosi parametų (neapskaičiavus tikrųjų jungimosi parametų) daromos išvados būtų klaidingos.

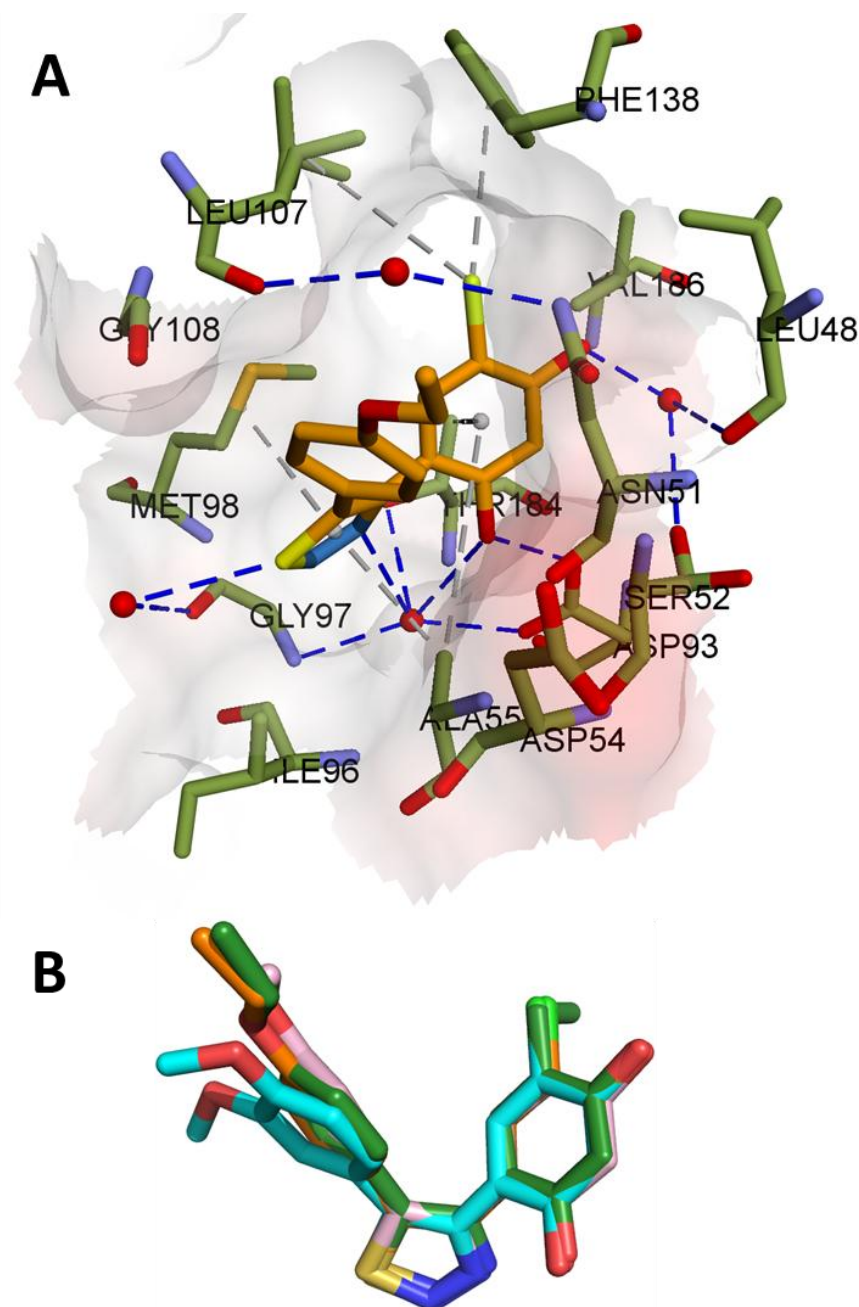


**13 pav.** Funkcinių grupių įtakos tikriesiems jungimosi termodinaminiais parametrams palyginimas. Grupės, lemiančios  $\Delta_b G_{\text{intr}}$  neigiamos vertės padidėjimą, atvaizduotos žaliai, o grupės, nepalankios jungimuisi, - raudonai. Nurodytų  $\Delta_b G_{\text{intr}}$ ,  $\Delta_b H_{\text{intr}}$  ir  $-T\Delta_b S_{\text{intr}}$  matavimo vienetai yra  $\text{kJ} \times \text{mol}^{-1}$  (su atitinkamomis paklaidomis  $\pm 1,1$ ,  $\pm 1,7$  ir  $\pm 2,0$ ),  $\Delta_b C_p - \text{J} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}$  (su paklaida  $\pm 125$ ).

Hsp90—ICPD kompleksų kristalinės struktūros leidžia pamatyti baltymo ir ligando atomų išsidėstymą (14 pav.). Visi keturi tirti ICPD junginiai žmogaus Hsp90 $\alpha$  ATP surišimo kišenėje išsidėsto beveik identišškai (14B pav.). Tiadiazolo žiedą kišenėje įtvirtina platus vandenilinių ryšių tinklas, kuriame dalyvauja vandens molekulės (14A pav.). Dėl antrosios metoksi grupės ICPD34 junginio benzeno žiedui tenka šiek tiek pasisukti tiadiazolio žiedo atžvilgiu. Tačiau šis pokytis turi mažai įtakos tikriesiems jungimosi termodinaminiais parametrams, nes šis benzeno žiedas yra išoriniame ATP surišimo kišenės pakraštyje (14A pav.).

Chloro grupė, būdinga trimis nagrinėtoms struktūroms, sudaro hidrofobinius kontaktus su F138 ir L107. ICPD62 atveju, etilo grupė geba sąveikauti su tomis pačiomis aminorūgštimis. Įdomu, kad chlorą turintiems ICPD junginiams yra būdingas ženkliai didesnis entalpinis indėlis į tikrąją jungimosi Gibso energiją. Cheminiu požiūriu, chloras

yra elektronus nutraukianti grupė, o etilas – elektronų donorinė grupė; šios pakaitų savybės galėtų skirtingai įtakoti *orto* ir *para* hidroksi grupių sudaromų vandenilinių ryšių stiprumą. Nepaisant to, nustatytose kompleksų struktūrose ICPD47 ir ICPD62 yra orientuoti vienodai (14B pav.), jokių esminių šių junginių sąveikos su Hsp90αN skirtumų nematyti. Tačiau kristalinių struktūrų kokybė yra per maža, kad galėtume patikimai nustatyti galimus menkus vandenilinių ryšių skirtumus, kurie galėtų paaiškinti  $\Delta_b H_{intr}$  neatitikimus.



**14 pav.** (A) Žmogaus Hsp90αN ATP surišimo kišenėje prisijungęs ICPD47 (oranžinis). Baltymo paviršius nuspalvintas pagal elektrostatinę krūvį, aminorūgštys atvaizduotos žaliai. Mėlynos punktyrinės linijos vaizduoja vandenilinius ryšius, pilkos – hidrofobines sąveikas. (B) Tirtų keturių ICPD junginių išsidėstymo Hsp90αN aktyviajame centre palyginimas. ICPD47 atvaizduotas geltonai, ICPD26 – rausvai, ICPD34 – žydrai, o ICPD62 – žaliai.

Alternatyvus tokių energijų profilių paaiškinimas galėtų būti unikalios halogenų (išskyrus fluora), sujungtų su aril ar kitomis panašiomis grupėmis, elektrostatinės savybės [44-46]. Be hidrofobinių kontaktų, halogenai taip pat gali dalyvauti įvairiose elektrostatinėse sąveikose, pvz., su fenilalanino  $\pi$  elektronais [45]. Be to, chloras tam tikromis sąlygomis gali sudaryti vandenilinius ryšius su C-H [46; 47]. Tokių ryšių ilgiai paprastai yra 3,0 Å ir daugiau (neretai ir daugiau nei 4,0 Å) [47], o tai atitinka atstumą tarp ICPD junginių chloro ir alifatinių L107 ir F138 metileno grupių. Nors ir silpni, tokie ryšiai yra specifiški [44] ir galėtų būti jungimosi entalpijos šaltinis. Didesnė ICPD62 jungimosi entropija galėtų būti dalinai paaiškinta didesniu etilo grupės labilumu.

Tirti ICPD junginiai turi dvi hidroksi grupes. Remdamiesi išskaičiuotomis  $pK_a$  vertėmis, mes prognozavome, kad *orto* padėtyje chloro atžvilgiu esanti hidroksi grupė galėtų dalyvauti nustatytame su jungimusi susijusiame protonizacijos reiškinyje (žr. 3.5 skyrelį). Iš struktūrinių duomenų matyti, kad ši hidroksi grupė dalyvauja vandenilinių ryšių tinkle kartu su vandens molekule, o kitas hidroksilas tiesiogiai sąveikauja su D93 (14A pav.). Bioinformatikos įrankiu „H++“ [13] iš struktūrinių duomenų suskaičiuota D93 šoninės grandinės  $pK_a$  yra apie 0,7. Tai reiškia, kad visomis šiame darbe tirtomis sąlygomis D93 karboksi grupė turėtų būti pilnai deprotonizuota. Tuo tarpu „Marvin“ programine įranga [12] apskaičiuotos labiausiai linkusių jonizuotis ICPD junginių grupių  $pK_a$  yra ~7,3 ICPD26, ICPD34 ir ICPD47 atvejais ir ~8,6 ICPD62 atveju. Šie duomenys tik patvirtina, kad ligandas, o ne Hsp90, protonizuojasi jungimosi reakcijos metu.

*Orto* pozicijoje chloro atžvilgiu esanti hidroksi grupė sudaro vandenilinį ryšį su vandens molekule, kurią toje vietoje pozicionuoja Hsp90 $\alpha$ N L48 ir S52 (14A pav.). Hsp90 $\beta$  vietoje šio serino turi alaniną, kuris negali sudaryti atitinkamo vandenilinio ryšio. Tai galėtų paaiškinti bendrai žemesnį Hsp90 $\beta$  giminingumą ICPD junginiams.

## 7. ICPD junginiai kaip Hsp90 slopikliai

### 7.1. ICPD junginių įtaka vėžinėms ląstelėms

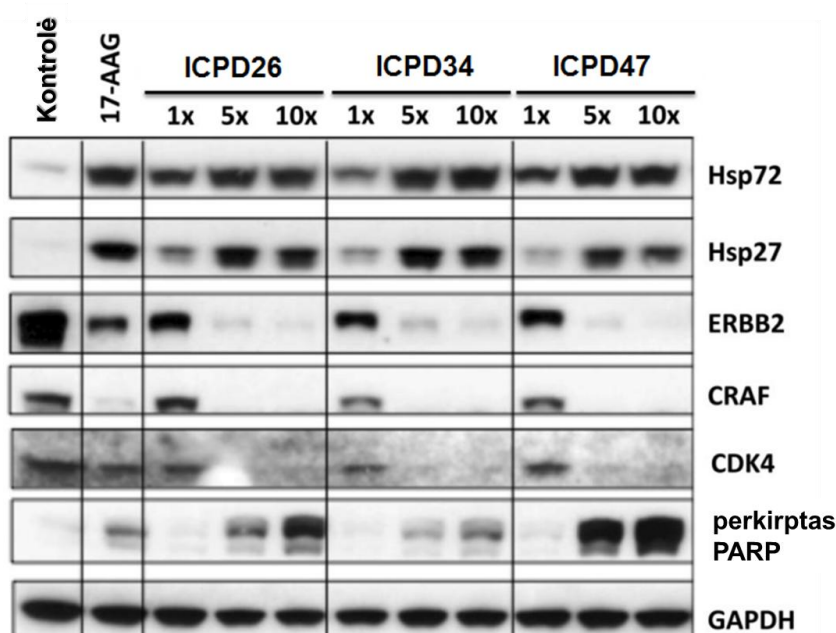
ICPD junginių įtaką žmogaus vėžinių ląstelių gyvybingumui ištyrė dr. J. Matulienė, dr. V. Petrikaitė (VU Biotechnologijos institutas, Lietuva) ir dr. S. Y. Sharp (Vėžio tyrimų institutas, Didžioji Britanija). Tyrimai buvo atlikti šiais Hsp90 ligandais paveikiant U2OS (osteosarkomos), HeLa (gimdos kaklelio vėžio) ir HCT116 (storosios žarnos vėžio) linijų ląsteles (3 lentelė). ICPD26, ICPD34 ir ICPD47 vėžinių ląstelių augimą slopino panašiai, o ICPD62 taip pat efektyviai veikė ir mažesnėmis dozėmis. ICPD60 yra struktūriškai labai panašus, tačiau su Hsp90 praktiškai nesijungiantis junginys (1 pav.). Prireikė kur kas didesnės ICPD60 koncentracijos tirtų vėžinių ląstelių augimui nuslopinti (3 lentelė).

Siekiant patvirtinti, kad ląstelių augimas buvo slopintas ICPD junginiams jungiantis ir slopinant Hsp90, o ne pašalinio junginių poveikio, dr. S. Y. Sharp atliko kelių plačiai pripažintų Hsp90 slopinimo biomarkerių tyrimą HCT116 ląstelėse (15 pav.). Paveikus šias ląsteles ICPD junginiais, jose buvo stebėta padidėjusi Hsp baltymų (Hsp72 ir Hsp27) raiška ir pasirinktų Hsp90 klientų (CRAF, ERBB2 ir CDK4) raiškos sumažėjimas. Abu šie požymiai rodo, kad vyko Hsp90 slopinimas. Padidėjęs sukirpto PARP kiekis rodo apoptozės pradžią.



**3 lentelė.** ICPD junginių gebėjimas slopinti vėžinių ląstelių augimą. Nurodytos vidurkinės  $EC_{50}$  vertės  $\pm$  standartinė paklaida, suskaičiuoti iš eilės eksperimentų. Visos vertės nurodytos  $\mu M$ .

Junginys \ Ląstelių linija	U2OS	HeLa	HCT116
ICPD26	5,6 $\pm$ 0,4	2,35 $\pm$ 0,02	3,2 $\pm$ 0,7
ICPD34	7,2 $\pm$ 0,5	3,13 $\pm$ 0,09	4,6 $\pm$ 0,4
ICPD47	8,3 $\pm$ 0,7	3,76 $\pm$ 0,33	4,6 $\pm$ 0,4
ICPD60	24,2 $\pm$ 0,1	19,5 $\pm$ 1,7	n.d.
ICPD62	0,70 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,02	n.d.



**15 pav.** Hsp90 slopinimo biomarkerių analizė HCT116 ląstelėse. Ląstelės buvo paveiktos 1 $\times$ , 5 $\times$  arba 10 $\times$   $GI_{50}$  koncentracijomis 24 h, tuomet buvo atlikta jų baltymų raiškos „Western blot“ analizė. Teigiama kontrolė – 17-AAG; GAPDH – užnešimo kontrolė. [48]

## 7.2. Perspektyvos

Hsp90 yra perspektyvus priešvėžinių vaistų taikinytis, be to, jo slopiklius galima būtų pritaikyti ir kai kurių kitų ligų gydymui. Nors su pora dešimčių Hsp90 slopiklių buvo ar yra atliekami klinikiniai tyrimai, dauguma atvejų tyrimai buvo nutraukti dėl įvairių pašalinių poveikių. Kadangi dauguma pašalinių poveikių skyrėsi skirtingų slopiklių atvejais, tikėtina, kad juos sukėlė pačių junginių pašalinės reakcijos, o ne Hsp90 slopinimas.

Atsižvelgiant į surinktus termodinaminius ir struktūrinius duomenis, tirti ICPD junginiai galėtų būti optimizuojami įvedant papildomas su Hsp90 sąveikaujančias grupes. Tai, kad ICPD62 slopina vėžinių ląstelių augimą kur kas efektyviau nei kiti trys tirti ICPD junginiai, nors jų  $K_{b\_intr}$  vertės ir yra panašios, galima būtų paaiškinti geresniu gebėjimu prasikverbti pro ląstelės membraną. Paprastai neutralų krūvį turinčios dalelės lengviau prasiskverbia per hidrofobinę ląstelės membraną nei krūvį turinčios. Dėl chloro pakaitą pakeitusios etilo grupės ICPD62 junginyje hidroksi grupės nėra jonizuotos esant

ląstelėms būdingam pH. Tačiau šis pakeitimas taip pat lemia ženklų jungimosi entalpijos sumažėjimą, todėl kiti trys nagrinėti ICPD junginiai yra tinkamesni tolesniam vystymui. Siekiant didinti ICPD26 ir ICPD47 junginių hidrofobiškumą, pakaitai turėtų būti įvedinėjami taip, kad nebūtų suardomos šių ligandų elektrostatinės sąveikos su Hsp90 ATP surišimo kišene. Tiesa, yra pastebėta, kad kartais išsivysto Hsp90 paviršiaus mutacijos, dėl kurių įgijamas atsparumas kai kuriems slopikliams [49; 50]. Todėl ICPD junginių nedidelis molekulinis svoris ir sąveikų tinklas su itin konservatyviomis Hsp90 aminorūgštimis galėtų būti privalumais.

Ištirtų junginių giminingumo tendencijos buvo panašios Hsp90  $\alpha$  ir  $\beta$  izoformų atvejais. Visi ICPD junginiai silpniau sąveikavo su Hsp90 $\beta$ . Šiame darbe mes parodėme, kad ICPD junginiai yra stiprūs, entalpiškai optimizuoti Hsp90 slopikliai, tinkami tolesniam vaistų kūrimui.

## IŠVADOS

1. ICPD junginiai stipriai (stebimos  $K_b$  vertės nuo  $4,8 \times 10^6$  iki  $1,65 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  – stipriau nei klasikinis slopiklis 17-AAG) jungiasi su žmogaus Hsp90 $\alpha$  ir Hsp90 $\beta$  izoformomis.
2. ICPD junginių giminingumas Hsp90 $\alpha$  izoformai yra nuo 4 iki 6 kartų didesnis nei Hsp90 $\beta$ .
3. ICPD junginių hidroksi grupės protonizacija yra būtina jungimuisi su Hsp90.
4. ICPD26, ICPD34 ir ICPD47 jungimosi su Hsp90 pagrindinė varomoji energija yra entalpija (~84 %), todėl jie yra tinkami kandidatai tolimesniam optimizavimui, o ICPD62 tikrąją jungimosi energiją sudaro entalpija ir entropija apylygėmis dalimis.
5. Chloro grupė padidina ICPD junginių jungimosi su Hsp90 entalpinį indėlį, o ICPD62 jos vietoje esanti etilo grupė didina entropinį indėlį. Tai parodo, kad chloras geba sudaryti papildomus, nehidrofobinės prigimties kontaktus.
6. Maži alkoksi pakaitai ICPD junginių benzeno žiede mažai įtakoja tikruosius jungimosi parametrus.

# MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

## Disertacijoje pateikta medžiaga paskelbta šiuose moksliniuose straipsniuose:

1. Sharp SY, Roe SM, **Kazlauskas E**, Cikotienė I, Workman P, Matulis D, Prodromou C. Co-crystallization and in vitro biological characterization of 5-aryl-4-(5-substituted-2,4-dihydroxyphenyl)-1,2,3-thiadiazole Hsp90 inhibitors. *PLoS One*. 2012;7(9):e44642.
2. **Kazlauskas E**, Petrikaitė V, Michailovienė V, Revuckienė J, Matulienė J, Grinius L, Matulis D. Thermodynamics of aryl-dihydroxyphenyl-thiadiazole binding to human Hsp90. *PLoS One*. 2012;7(5):e36899.
3. Cikotienė I, **Kazlauskas E**, Matulienė J, Michailovienė V, Torresan J, Jachno J, Matulis D. 5-Aryl-4-(5-substituted-2,4-dihydroxyphenyl)-1,2,3-thiadiazoles as inhibitors of Hsp90 chaperone. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19(4):1089-92.

## Patentai:

Matulis D., Cikotienė I., **Kazlauskas E.**, Matulienė J. 5-aryl-4-(5-substituted 2,4-dihydroxyphenyl)-1,2,3-thiadiazoles as inhibitors of Hsp90 chaperone and the intermediates for production thereof. US 831413220. 2012-12-20.

Matulis D., Cikotienė I., **Kazlauskas E.**, Matulienė J. 5-aryl-4-(5-substituted 2,4-dihydroxyphenyl)-1,2,3-thiadiazoles as inhibitors of Hsp90 chaperone and the intermediates for production thereof. EP 2268626 B1. 2012-02-01.

D. Matulis, I. Čikotienė, **E.Kazlauskas**, J. Matulienė. 5-aryl-4-(5-pakeistieji 2,4-dihidroksifenil)-1,2,3-tiacilazolai kaip Hsp90 šaperono slopikliai ir tarpiniai junginiai jiems gauti. LT 5623 B. 2010-01-25.

## Kitos publikacijos:

1. Dudutienė V, Matulienė J, Smirnov A, Timm DD, Zubrienė A, Baranauskienė L, Morkūnaite V, Smirnovienė J, Michailovienė V, Juozapaitienė V, Mickevičiūtė A, Kazokaitė J, Bakšytė S, Kasiliauskaitė A, Jachno J, Revuckienė J, Kišonaitė M, Pilipuitytė V, Ivanauskaitė E, Milinavičiūtė G, Smirnovas V, Petrikaitė V, Kairys V, Petrauskas V, Norvaišas P, Lingė D, Gibieža P, Capkauskaitė E, Zakšauskas A, **Kazlauskas E**, Manakova E, Gražulis S, Ladbury JE, Matulis D. Discovery and characterization of novel selective inhibitors of carbonic anhydrase IX. *J Med Chem*. 2014;57(22):9435-46.
2. Giessrigl B, Krieger S, Rosner M, Huttary N, Saiko P, Alami M, Messaoudi S, Peyrat JF, Maciuk A, Gollinger M, Kopf S, **Kazlauskas E**, Mazal P, Szekeres T, Hengstschläger M, Matulis D, Jäger W, Krupitza G. Hsp90 stabilizes Cdc25A and counteracts heat shock-mediated Cdc25A degradation and cell-cycle attenuation in pancreatic carcinoma cells. *Hum Mol Genet*. 2012;21(21):4615-27.
3. Zubrienė A, **Kazlauskas E**, Baranauskienė L, Petrauskas V, Matulis D. Isothermal titration calorimetry and thermal shift assay in drug design. *Eur Pharm Rev* 2011;16:56-59.

**Disertacijoje pateikta medžiaga buvo pristatyta 26-iose tarptautinėse konferencijose. Medžiagą pats pristačiau šiose konferencijose:**

1. **Kazlauskas E.**, Petrikaitė V., Matulis D. Thermodynamics of Aryl-dihydroxyphenyl-thiadiazole Inhibitor Series Binding to Molecular Chaperone Hsp90. 2nd Central and Eastern European Conference on Thermal Analysis and Calorimetry. Vilnius, Lithuania, 2013 08 27–30.
2. **Kazlauskas E.**, Matulis D. Thermodynamics of aryl-dihydroxyphenyl-thiazole binding to HSP90. 6th International Conference on the Hsp90 Chaperone Machine. Les Diablerets, Switzerland, 2012 09 19–23.
3. **Kazlauskas E.**, Čikotienė I., Matulienė J., Zubrienė A., Grinius L., Jachno J., Torresan J., Michailovienė V., Petrikaitė V., Matulis D. Resorcinol Class Hsp90 Inhibitors Binding Thermodynamics and the Effect on Cancerous Cells. 4th International Conference on the Hsp90 Chaperone Machine. Seon, Germany, 2008 10 02–06.

# CURRICULUM VITAE

<b>Vardas, Pavardė</b>	Egidijus Kazlauskas
<b>Gimimo data</b>	1981 12 02
<b>Darbo adresas</b>	Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyrius Vilniaus universiteto Biotechnologijos institutas Saulėtekio 7 Vilnius, LT-10222
<b>Telefonai</b>	852239412 (darbo) +370 618 55673 (asmeninis)
<b>E-paštas</b>	ekazl@ibt.lt
<b>Išsilavinimas</b>	
2000-2004	Biochemijos bakalauras Vilniaus universitetas (Vilnius, Lietuva)
2004-2006	Biochemijos magistras Vilniaus universitetas (Vilnius, Lietuva)
<b>Darbo patirtis</b>	Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto
2002-2006	Laborantas Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyriuje
2006-2013	Bioinžinierius Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje
2013-dabar	Jaunesnysis mokslo darbuotojas Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje

## PADĖKA

Norėčiau išreikšti nuoširdžią padėką visiems žmonėms, prisidėjusiems prie šio darbo.

Visų pirma dėkoju savo vadovui prof. dr. D. Matuliui už galimybę dirbti jo komandoje, diskusijas, neaprėpiamą optimizmą ir galybę raginimų gintis disertaciją.

Dėkoju V. Michailovienei ir jos prižiūrėtiems studentams už stabilų Hsp90 baltymų tiekimą, prof. dr. I. Čikotienei už ICPD junginius, dr. J. Matulienei už pirminius Hsp90 raiškos vektorius ir ląstelių tyrimus, dr. S. Y. Sharp (Vėžio tyrimų institutas, Londonas) už ląstelių tyrimus bei dr. S. M. Roe ir dr. C. Prodromou (Susekso universitetas) už išspręstas Hsp90—ICPD kristalines struktūras.

Esu dėkingas visiems mano bendradarbiams Biotermodinamikos ir vaistų kūrimo skyriuje, ypač dr. L. Baranauskienei už daugybę diskusijų ir patarimų, dr. A. Zubrienei už vertingus aptarimus ir pasiūlymus rašant šį darbą, dr. V. Petrikaitei už pagalbą interpretuojant ląstelių tyrimų duomenis ir kitas diskusijas, dr. V. Petrauskui už sveiką šio darbo kritiką ir blaivų požiūrį bei dr. V. Kairiui už šios disertacijos pataisymus.

Taip pat dėkoju dr. Mindaugui Zarembai ir dr. Sauliui Servai, recenzavusiems šią disertaciją.

Norėčiau padėkoti savo chemijos mokytojui J. Lagunavičiui, kuris sutvirtino mano apsisprendimą studijuoti biochemiją, ir dr. G. Sasnauskui už mano pirmuosius žingsnius biocheminėje laboratorijoje.

Esu labiausiai dėkingas savo tėvams už jų rūpestį ir paramą, ir už meilę gamtai, kurią manyje išugdė nuo mažų dienų. Nuoširdžiausias ačiū mano brangiausiai žmonai Miglei už supratingumą. Taip pat norėčiau padėkoti savo galybei augintinių ir augalų bei patikimai DnD kompanijai už moralinį palaikymą.

## SUMMARY

Despite many advances in modern medicine, severe diseases are still pretty common. For instance, statistically every second person will suffer from some type of cancer during his life [1], and quite a lot of these cases will be incurable. Due to its adaptability and persistence, traditional approaches to anticancer drug design often prove unsatisfactory: while the drug molecule inhibits one seemingly vital protein, the cancer cell finds different paths to circumvent this and proliferate.

The heat shock protein 90 (Hsp90) is a chaperone that, while catering only for a limited clientele, manages to impact a significant fraction of proteome. This is achieved through chaperoning proteins that are hubs of many biological networks such as transcriptional factors and kinases [2]. Molecular mechanisms of the 6 hallmarks of cancer cells all involve Hsp90 clients [3]. Moreover, cancer cells tend to depend heavily on chaperones to maintain their mutated proteins and preserve proteostasis. Therefore successfully drugging Hsp90 might be the strike at the heart of oncogenic processes that is needed for the development of effective anticancer therapy. Furthermore, accumulated data suggests that inhibiting Hsp90 might be employed in fighting various other illnesses, including protozoan and neurodegenerative diseases.

While there are several synthetic Hsp90 inhibitors in development and in clinical trials, no Hsp90 targeting agent is currently available on the market. Most of the investigated Hsp90 inhibitors exhibited various side-effects that restrict their usage. As most of these traits do not seem to be caused by the Hsp90 inhibition itself, there is a high demand of new, efficacious Hsp90 inhibitors.

Historically, drug development has been structure-based optimisation of binding contacts; however, such approaches do not offer deeper understanding of the driving forces underlying the molecular interactions, which can be explored by thermodynamic analysis [4]. Currently one of the biggest challenges in molecular biophysics is understanding the emerging correlation of thermodynamic and structural data [7]. It has to be noted that the thermodynamic data observed directly during experiments does not always correlate well with the structural data. Therefore intrinsic parameters have to be calculated by eliminating contribution of various events that accompany binding. However, at this stage such studies still have to be conducted in a case-by-case scenario, in order to map the differences in intrinsic binding energetics that accompany minor changes in chemical structure.

A series of potential Hsp90 inhibitors, aryl-dihydroxyphenyl-thiadiazoles, has been synthesised at Vilnius University. The goal of this study was to explore the structure-thermodynamics relationship for aryl-dihydroxyphenyl-thiadiazoles binding to human Hsp90. We employed isothermal titration calorimetry in conjunction with protein denaturation profile analysis techniques in order to dissect the thermodynamic mechanism of the protein–ligand binding event. In this work we provide a detailed thermodynamic characterisation of these inhibitors binding to recombinant human Hsp90, both  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms. We show for the first time that protonation of hydroxyl residue in resorcinol-based Hsp90 inhibitors is essential for binding. Comparison of thermodynamic and structural data signified the ability of chlorine to form interactions of non-hydrophobic nature. As generally enthalpic contribution to the ligand affinity is



more difficult to improve than the entropic contribution [5; 6], the mostly enthalpy-driven binding of three of our compounds makes them excellent candidates for further lead development.

# LITERATŪROS SARAŠAS

- [1] CancerResearch UK (accessed in 2016). [www.cancerresearchuk.org](http://www.cancerresearchuk.org), "Cancer risk statistics".
- [2] Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, *11* (7), 515-528.
- [3] Banerji U. *Clin Cancer Res* **2009**, *15* (1), 9-14.
- [4] Garbett NC, Chaires JB. *Expert Opin Drug Discov* **2012**, *7* (4), 299-314.
- [5] Freire E. *Drug Discov Today* **2008**, *13* (19-20), 869-874.
- [6] Ferenczy GG, Keseru GM. *Future Med Chem* **2015**, *7* (10), 1285-1303.
- [7] Ladbury JE. *Biochem Soc Trans* **2010**, *38* (4), 888-893.
- [8] Baker BM, Murphy KP. *J Mol Biol* **1997**, *268* (2), 557-569.
- [9] Tellinghuisen J. *Anal Biochem* **2003**, *321* (1), 79-88.
- [10] Wiseman T, Williston S, Brandts JF, Lin LN. *Anal Biochem* **1989**, *179* (1), 131-137.
- [11] Broecker J, Vargas C, Keller S. *Anal Biochem* **2011**, *418* (2), 307-309.
- [12] ChemAxon (2012). Marvin Calculator Plugins were used for structure property prediction and calculation, MarvinSketch 5.11.3.
- [13] Anandakrishnan R, Aguilar B, Onufriev AV. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40* (Web Server issue), W537-541.
- [14] Baker BM, Murphy KP. *Biophys J* **1996**, *71* (4), 2049-2055.
- [15] BIOVIA DS (2015). Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.5, San Diego: Dassault Systèmes.
- [16] Schrodinger, LLC (2015). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.
- [17] Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, ..., Boyd MR. *Cancer Res* **1988**, *48* (17), 4827-4833.
- [18] Kelland LR, Sharp SY, Rogers PM, Myers TG, Workman P. *J Natl Cancer Inst* **1999**, *91* (22), 1940-1949.
- [19] Jhaveri K, Taldone T, Modi S, Chiosis G. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1823* (3), 742-755.
- [20] Dymock BW, Barril X, Brough PA, Cansfield JE, Massey A, McDonald E, ..., Drysdale MJ. *J Med Chem* **2005**, *48* (13), 4212-4215.
- [21] Sharp SY, Prodromou C, Boxall K, Powers MV, Holmes JL, Box G, ..., Workman P. *Mol Cancer Ther* **2007**, *6* (4), 1198-1211.
- [22] Brough PA, Barril X, Borgognoni J, Chene P, Davies NG, Davis B, ..., Wright L. *J Med Chem* **2009**, *52* (15), 4794-4809.
- [23] Jhaveri K, Modi S. *Adv Pharmacol* **2012**, *65*, 471-517.
- [24] Freire E. *Drug Discov Today Technol* **2004**, *1* (3), 295-299.
- [25] Velazquez Campoy A, Freire E. *Biophys Chem* **2005**, *115* (2-3), 115-124.
- [26] Velazquez-Campoy A, Ohtaka H, Nezami A, Muzammil S, Freire E. *Curr Protoc Cell Biol* **2004**, *Chapter 17*, Unit 17 18.
- [27] Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. *Cell* **1997**, *90* (1), 65-75.
- [28] Nilapwar S, Williams E, Fu C, Prodromou C, Pearl LH, Williams MA, Ladbury JE. *J Mol Biol* **2009**, *392* (4), 923-936.
- [29] Cimpmperman P, Baranauskiene L, Jachimoviciute S, Jachno J, Torresan J, Michailoviene V, ..., Matulis D. *Biophys J* **2008**, *95* (7), 3222-3231.
- [30] Todd M, Salemme F. *Genetic Engineering News* **2003**, *23* (3), 28-29.
- [31] Matulis D, Kranz JK, Salemme FR, Todd MJ. *Biochemistry* **2005**, *44* (13), 5258-5266.
- [32] Chiu MH, Prenner EJ. *J Pharm Bioallied Sci* **2011**, *3* (1), 39-59.
- [33] Clas SD, Dalton CR, Hancock BC. *Pharm Sci Technolo Today* **1999**, *2* (8), 311-320.
- [34] Senisterra GA, Finerty PJ, Jr. *Mol Biosyst* **2009**, *5* (3), 217-223.
- [35] Ladbury JE, Williams MA. *Curr Opin Struct Biol* **2004**, *14* (5), 562-569.

- [36] Zubriene A, Matuliene J, Baranauskiene L, Jachno J, Torresan J, Michailoviene V, ..., Matulis D. *Int J Mol Sci* **2009**, *10* (6), 2662-2680.
- [37] Matulis D. Baltymų fizikinė chemija Lietuvos Respublikos švietimo ir mokslo ministerija, Vilniaus universitetas, Technologija: 2008.
- [38] Ladbury JE, Klebe G, Freire E. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9* (1), 23-27.
- [39] Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. *J Med Chem* **1999**, *42* (2), 260-266.
- [40] Barril X, Beswick MC, Collier A, Drysdale MJ, Dymock BW, Fink A, ..., Wright L. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, *16* (9), 2543-2548.
- [41] Zubriene A, Gutkowska M, Matuliene J, Chaleckis R, Michailoviene V, Voroncova A, ..., Matulis D. *Biophys Chem* **2010**, *152* (1-3), 153-163.
- [42] Gooljarsingh LT, Fernandes C, Yan K, Zhang H, Grooms M, Johanson K, ..., Tummino PJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (20), 7625-7630.
- [43] Olsson TS, Williams MA, Pitt WR, Ladbury JE. *J Mol Biol* **2008**, *384* (4), 1002-1017.
- [44] Bissantz C, Kuhn B, Stahl M. *J Med Chem* **2010**, *53* (14), 5061-5084.
- [45] Wilcken R, Zimmermann MO, Lange A, Joerger AC, Boeckler FM. *J Med Chem* **2013**, *56* (4), 1363-1388.
- [46] Taylor RK, O. *J Am Chem Soc* **1982**, *104* (19), 5063-5070.
- [47] Aakeroy CBE, T. A.; Seddon, K. R.; Palinko, I. . *New J Chem* **1999**, *23* (2), 145-152.
- [48] Sharp SY, Roe SM, Kazlauskas E, Cikotiene I, Workman P, Matulis D, Prodromou C. *PLoS One* **2012**, *7* (9), e44642.
- [49] Prodromou C, Nuttall JM, Millson SH, Roe SM, Sim TS, Tan D, ..., Piper PW. *ACS Chem Biol* **2009**, *4* (4), 289-297.
- [50] Millson SH, Chua CS, Roe SM, Polier S, Solovieva S, Pearl LH, ..., Piper PW. *FASEB J* **2011**, *25* (11), 3828-3837.

